



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**ESTUDIO DEL DOMINIO DE UNIÓN A DNA DE LA  
PROTEÍNA TERMINAL DEL BACTERIÓFAGO  $\phi$ 29 Y SU  
PAPEL EN LA REPLICACIÓN DEL DNA VIRAL**

**TESIS DOCTORAL**

**Isabel María Holguera López**

**Madrid, 2015**



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**ESTUDIO DEL DOMINIO DE UNIÓN A DNA DE LA  
PROTEÍNA TERMINAL DEL BACTERIÓFAGO  $\phi$ 29 Y SU  
PAPEL EN LA REPLICACIÓN DEL DNA VIRAL**

Memoria de investigación presentada por la Lda. en Biología  
Isabel María Holguera López  
para optar al grado de Doctora en Biología Molecular  
por la Universidad Autónoma de Madrid.

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el  
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC/UAM)  
bajo la dirección de la Doctora Margarita Salas Falgueras  
y el Doctor Daniel Muñoz Espín.





*El mayor enemigo del conocimiento no es la ignorancia,  
sino la ilusión de conocimiento.*

Stephen Hawking



Abreviaturas .....	1
Glosario de términos no castellanos incluidos en esta Tesis.....	3
Resumen.....	5
<i>Summary</i> .....	7
<b>Introducción .....</b>	<b>9</b>
<b>1. La bacteria <i>Bacillus subtilis</i>.....</b>	<b>11</b>
1.1. Organización del material genético en <i>B. subtilis</i> .....	12
1.2. Replicación del material genético en <i>B. subtilis</i> .....	14
1.2.1. Iniciación de la replicación en <i>B. subtilis</i> .....	14
1.2.2. Terminación de la replicación en <i>B. subtilis</i> .....	16
1.3. Segregación del cromosoma en <i>B. subtilis</i> .....	17
<b>2. El bacteriófago <math>\phi 29</math> .....</b>	<b>20</b>
2.1. Organización genética y transcripcional del DNA del bacteriófago $\phi 29$ .....	21
2.2. Replicación del DNA del bacteriófago $\phi 29$ <i>in vitro</i> : mecanismo de replicación iniciada con TP..	23
2.3. Organización de la replicación del bacteriófago $\phi 29$ <i>in vivo</i> .....	25
2.4. La TP del bacteriófago $\phi 29$ .....	28
<b>Objetivos.....</b>	<b>31</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>35</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>51</b>
<b>Capítulo 1: Organización de la replicación del bacteriófago <math>\phi 29</math> <i>in vivo</i>. Implicación del dominio N-terminal de la TP de <math>\phi 29</math> en la localización subcelular de la maquinaria replicativa viral .....</b>	<b>53</b>
1.1. La TP de $\phi 29$ localiza en el nucleoide de <i>B. subtilis</i> en ausencia de otros componentes virales....	55
1.2. La TP de $\phi 29$ localiza en el nucleoide de <i>E. coli</i> en ausencia de otros componentes virales .....	56
1.3. La TP del bacteriófago PRD1 localiza en el nucleoide de <i>E. coli</i> y de <i>B. subtilis</i> en ausencia de otros componentes virales.....	57

1.4. La TP parental de $\phi 29$ localiza en el nucleoide bacteriano independientemente de la TP iniciadora .....	58
1.5. Localización subcelular de la TP de $\phi 29$ durante el ciclo infectivo.....	59
1.6. El dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ es el responsable de su localización en el nucleoide bacteriano .....	59
1.7. El dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ se une a DNA <i>in vitro</i> de manera inespecífica de secuencia .....	61
1.8. El dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ es necesario para una replicación eficiente del DNA viral <i>in vivo</i> .....	62
1.9. La TP de $\phi 29$ determina la localización de la DNA polimerasa viral en el nucleoide bacteriano, y ambas proteínas se distribuyen formando un patrón tipo helicoidal a medida que avanza el ciclo celular.....	63
1.10. La distribución tipo helicoidal de la TP de $\phi 29$ depende de la proteína del citoesqueleto bacteriano de actina MreB .....	65
1.11. La RNA polimerasa de <i>B. subtilis</i> colocaliza con la TP de $\phi 29$ en el nucleoide bacteriano .....	66
1.12. La TP de $\phi 29$ no interacciona con las proteínas asociadas al nucleoide bacteriano HBSu, Noc, SMC y ScpA en experimentos de doble híbrido en levadura .....	67

## **Capítulo 2: Estudio de los residuos básicos del dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ implicados en unión a DNA y en su localización en el nucleoide bacteriano .....**

2.1. Determinación de la estructura secundaria del dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ .....	71
2.2. Determinación de los residuos básicos del dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ implicados en la localización de la TP en el nucleoide bacteriano .....	72
2.3. Efecto de las mutaciones en residuos básicos del dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ en la unión a DNA <i>in vitro</i> .....	76
2.4. La TP de $\phi 29$ se une al DNA genómico de <i>B. subtilis</i> <i>in vivo</i> . Efecto de las mutaciones en residuos básicos del dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ en la unión a DNA <i>in vivo</i> .....	78
2.5. Efecto de las mutaciones en residuos básicos del dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ en la localización de la DNA polimerasa viral .....	80

2.6. Efecto de las mutaciones en residuos básicos del dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ en la replicación del DNA viral <i>in vivo</i> .....	82
---	----

### **Capítulo 3: Implicación de la capacidad de unión a DNA de la TP de $\phi 29$ en el mecanismo de replicación del DNA viral *in vitro*. Papel de la proteína p6 en las primeras etapas de la replicación.....85**

3.1. Los mutantes de la TP de $\phi 29$ afectados en la unión a DNA están afectados en la iniciación de la replicación del TP-DNA viral .....	87
3.2. El dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ es necesario para una correcta interacción con la DNA polimerasa viral.....	89
3.3. La proteína p6 compensa el defecto de iniciación de los mutantes de la TP de $\phi 29$ afectados en unión a DNA .....	91
3.4. La utilización de las TPs mutantes K27A y K25A/K27A como cebadores aumenta la $K_m$ de la DNA polimerasa por el nucleótido iniciador. En presencia de la proteína p6, la $K_m$ de la DNA polimerasa por el nucleótido iniciador es similar utilizando tanto la TP <i>wild-type</i> como las TPs mutantes como cebadores.....	94
3.5. Los mutantes de la TP de $\phi 29$ afectados en unión a DNA están afectados en la etapa de transición de la iniciación con proteína terminal a la elongación con DNA .....	95
3.6. Replicación del TP-DNA de $\phi 29$ <i>in vitro</i> utilizando las TPs mutantes en el dominio N-terminal como cebadores.....	97
3.7. El dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ es necesario para la amplificación del TP-DNA viral <i>in vitro</i> .....	98

### **Discusión.....101**

1. Papel del dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ en la replicación del DNA viral <i>in vivo</i> .....	103
2. Papel del dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ en la replicación del DNA viral <i>in vitro</i> .....	112

### **Conclusiones .....119**

### **Bibliografía .....123**

### **Material Suplementario.....153**



**ATP:** adenosina-5'-trifosfato

**BER:** ruta de reparación por escisión de bases (del inglés, *Base Excision Repair*).

**BSA:** seroalbúmina bovina (del inglés, *Bovine Serum Albumin*).

**cc:** campo claro

**CFP:** proteína fluorescente cian (del inglés, *Cyan Fluorescent Protein*).

**CI:** coeficiente de inmunoprecipitación.

**C-terminal:** carboxilo-terminal.

**dAMP:** 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato.

**dATP:** 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato.

**DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol

**DBP:** proteína de unión a DNA de banda doble (del inglés, *Double-stranded Binding Protein*).

**DC:** dicroísmo circular.

**dCTP:** 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato.

**dGTP:** 2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato.

**DNA:** ácido desoxirribonucleico (del inglés, *DeoxyriboNucleic Acid*).

**dNMP:** 2'-desoxinucleósido-5'-monofosfato.

**dNTP:** 2'-desoxinucleósido-5'-trifosfato.

**DO<sub>600</sub>:** densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm.

**ds:** banda doble (del inglés, *double-stranded*).

**DTT:** ditioneitol.

**dTTP:** 2'-desoxitimidina-5'-trifosfato.

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético (del inglés, *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*).

**FA:** factor de amplificación.

**GFP:** proteína fluorescente verde (del inglés, *Green Fluorescent Protein*).

**IPTG:** isopropil β-D-tiogalactopiranosido.

**Kb:** Kilo base.

**KDa:** Kilo Dalton.

**LB:** medio de cultivo Luria Bertani.

**mer:** número de nucleótidos de un oligómero.

**MOI:** multiplicidad de infección (del inglés, *Multiplicity Of Infection*).

**Mpb:** mega par de bases.

**NAP:** proteína asociada al nucleóide (del inglés, *Nucleoid Associated Protein*).

**NLS:** secuencia de localización nuclear (del inglés, *Nuclear Localization Signal*).

**N-terminal:** amino-terminal.

**OH:** hidroxilo.

## Abreviaturas

---

**p/v:** peso/volumen.

**PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés, *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*).

**pb:** par de bases.

**PBP:** proteína de unión de penicilina (del inglés, *Penicillin-Binding Protein*).

**PBS:** tampón fosfato salino (del inglés, *Phosphate Buffered Saline*).

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*).

**RBS:** sitio de unión del ribosoma (del inglés, *Ribosome Binding Site*).

**RNA:** ácido ribonucleico (del inglés, *RiboNucleic Acid*).

**RNase:** ribonucleasa

**qPCR:** PCR cuantitativa en tiempo real (del inglés, *quantitative real-time PCR*).

**RTP:** proteína terminadora de la replicación en *B. subtilis* (del inglés, *Replication Termination Protein*).

**SDS:** dodecilsulfato sódico (del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate*).

**ss:** banda sencilla (del inglés, *single-stranded*).

**SSB:** proteína de unión a DNA de banda sencilla (del inglés, *Single-Stranded Binding protein*).

**su<sup>+</sup>:** estirpe supresora

**su<sup>-</sup>:** estirpe no supresora

**sus:** fago mutante condicional sensible a la supresión de la mutación que contiene en su genoma (del inglés, *suppressor-sensitive*). Este tipo de fagos son deficientes en la síntesis de alguna proteína viral debido a la introducción en su secuencia de una mutación sin sentido, y sólo pueden replicarse de manera similar a la *wild-type* en una estirpe supresora de la mutación.

**TP:** proteína terminal (del inglés, *Terminal Protein*).

**TP-dAMP:** complejo covalente formado entre la proteína terminal y el nucleótido iniciador.

**TP-DNA:** DNA con proteína terminal covalentemente unida a los extremos 5'.

**TP-dNMP:** complejo covalente formado entre la proteína terminal y un dNMP.

**Tris:** tri(hidroximetil) aminometano.

**UDG:** uracil DNA glicosilasa.

**UV:** ultravioleta

**v/v:** volumen/volumen.

**wt:** tipo natural o silvestre, sin modificación genética (del inglés, *wild-type*).

**X-ChiP:** inmunoprecipitación de cromatina entrecruzada (del inglés, *Cross-linked Chromatin Immunoprecipitation*).

**YFP:** proteína fluorescente amarilla (del inglés, *Yellow Fluorescent Protein*).



**Background:** contexto genético.

**Clamp loader:** proteínas encargadas de posicionar la abrazadera deslizante.

**Cluster:** agrupación.

**Crowding:** aglomeración molecular.

**De novo:** desde el principio.

**Diffusion-ratchet:** mecanismo de partición activa de plásmidos mediante el sistema *parABS*, en el que los plásmidos replicados se segregan en direcciones celulares opuestas mediante la unión y desunión repetida del complejo parBS al nucleóide bacteriano, siguiendo un gradiente de concentración de parA.

**Foci:** plural de focus.

**Focus:** foco de localización subcelular de un componente celular.

**Loci:** plural de locus.

**Locus:** posición de un gen o marcador en el genoma.

**Loop:** estructura flexible con forma de bucle o lazo presente en determinados dominios de algunas proteínas.

**Histone-like protein:** proteína tipo histona.

**Merge:** combinación.

**Pellet:** material insoluble precipitado.

**Piggy-backing:** producción de retraso de un sustrato de DNA en ensayos de retraso en gel debido a la interacción de una molécula de proteína A con otra molécula de proteína B unida previamente al DNA y no a la interacción directa de la primera (A) con el DNA.

**Primer:** cebador o iniciador de la replicación. Puede ser un fragmento de DNA, RNA o el grupo hidroxilo de una proteína.

**Priming loop:** *loop* en el que se localiza el residuo iniciador de la TP de  $\phi 29$ .

**Random-coil:** estructura secundaria desordenada.

**Sliding-back:** Término empleado para describir el mecanismo de translocación hacia atrás del complejo TP-dAMP tras la reacción de iniciación para recuperar la información del primer nucleótido en 3' de la cadena molde.

**Sliding-clamp:** abrazadera deslizante. Complejo proteico que confiere procesividad a las DNA polimerasas replicativas durante el proceso de replicación.

**Time-lapse:** técnica de microscopía en células vivas en la que se toman imágenes de un campo de visión de forma repetida a lo largo de un tiempo determinado y luego se reproducen a una velocidad mayor del intervalo de adquisición entre fotograma y fotograma.

**Wild-type:** tipo natural o silvestre, sin modificación genética.



El mecanismo de replicación iniciada con proteína terminal (TP) del bacteriófago  $\phi 29$  ha sido extensamente estudiado *in vitro*. Sin embargo, se conoce muy poco sobre la organización espacial y temporal de la replicación de  $\phi 29$  *in vivo*. En la presente Tesis se ha estudiado la localización subcelular de los principales componentes de la maquinaria replicativa del bacteriófago  $\phi 29$ , es decir, la TP y la DNA polimerasa viral. Tanto la TP iniciadora como la TP parental localizan en el nucleóide bacteriano en ausencia de otros componentes virales. Por otra parte, la localización de la DNA polimerasa viral tiene lugar a lo largo de toda la longitud celular cuando es expresada de manera individual, pero localiza en el nucleóide bacteriano cuando es coexpresada junto con la TP. Por tanto, la expresión de la TP determina la localización de la DNA polimerasa viral en el nucleóide bacteriano. Durante el proceso infectivo, ambas proteínas colocalizan con el nucleóide bacteriano, siguiendo su dinámica de segregación. En etapas intermedias del ciclo celular tanto la TP como la DNA polimerasa viral exhiben un patrón de localización tipo helicoidal en células infectadas, patrón que depende de la proteína del citoesqueleto tipo actina de *Bacillus subtilis* MreB. Además, se ha determinado que el dominio N-terminal de la TP es el responsable de su localización en el nucleóide bacteriano, mostrando que la presencia de este dominio es esencial para que se dé una replicación eficiente del DNA viral durante la infección.

Trabajos anteriores determinaron que el dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$  tiene capacidad de unión a DNA *in vitro*. En la presente Tesis se han estudiado los residuos aminoácidos del dominio N-terminal de la TP implicados en su unión a DNA. Asimismo, se ha determinado que la TP de  $\phi 29$  se une al DNA genómico de *B. subtilis* *in vivo*, encontrándose una correlación entre la capacidad de unión a DNA y la localización en el nucleóide bacteriano.

La resolución de la estructura cristalográfica del heterodímero formado por la DNA polimerasa y la TP no permitió determinar la estructura del dominio N-terminal de la TP, al encontrarse desordenado en el cristal. En la presente Tesis se ha analizado la estructura secundaria del dominio N-terminal mediante dicroísmo circular, mostrando que tiene un alto contenido en  $\alpha$ -hélice. Por otra parte, se ha estudiado el papel que la unión a DNA de la TP puede tener en la replicación del DNA viral *in vitro* mediante la caracterización bioquímica de TPs mutantes en residuos básicos del dominio N-terminal, encontrándose que los mutantes defectivos en unión a DNA están afectados en diferentes etapas de este proceso. La proteína viral de unión a DNA de doble banda p6 compensa los defectos de iniciación y transición de estas TPs mutantes. Además, se ha determinado que el dominio N-terminal de la TP es necesario para una unión eficiente a la DNA polimerasa, así como para la amplificación del TP-DNA *in vitro*. En conjunto, estos resultados nos permiten proponer un papel del dominio N-terminal de la TP en el reconocimiento y apertura del origen de replicación.



The protein-priming mechanism of bacteriophage  $\phi 29$  DNA replication has been extensively studied *in vitro*. However, little is known about the spatial and temporal organization of the  $\phi 29$  replication process *in vivo*. In this Thesis the subcellular localization of the main components of the bacteriophage  $\phi 29$  replicative machinery has been studied, *i.e.*, the terminal protein (TP) and the viral DNA polymerase. Both the primer and parental TP localize at the bacterial nucleoid in the absence of other viral components. On the other hand, the DNA polymerase localizes along the cellular length when it is expressed individually, but it localizes at the bacterial nucleoid when it is co-expressed together with TP. Therefore, TP expression determines DNA polymerase localization at the bacterial nucleoid. During infection, both proteins colocalize at the bacterial nucleoid following its segregation dynamics. At middle stages of the cell cycle both the TP and the DNA polymerase display a helix-like localization pattern in infected cells, this pattern depending on the *Bacillus subtilis* actin-like cytoskeleton protein MreB. Furthermore, it has been determined that the TP N-terminal domain is responsible for its nucleoid localization, being the presence of this domain essential for an efficient viral DNA replication during the infective process.

Previous works have shown that the TP N-terminal domain possesses DNA binding capacity *in vitro*. In this Thesis the TP N-terminal domain amino acidic residues involved in DNA binding have been studied. Additionally, it has been determined that  $\phi 29$  TP binds *B. subtilis* genomic DNA *in vivo*, finding a correlation between DNA binding capacity and nucleoid localization.

The resolution of the crystallographic structure of the heterodimer formed by the DNA polymerase and the TP could not solve the structure of the TP N-terminal domain, as it was disordered in the crystal lattice. In the present work the secondary structure of the TP N-terminal domain has been analysed by circular dichroism, showing that it has a high proportion of  $\alpha$ -helix. Additionally, by means of the biochemical characterisation of mutant TPs in basic residues of the N-terminal domain, the possible role of TP DNA binding capacity in viral DNA replication *in vitro* has been studied. TP mutants defective in DNA binding are affected in performing different stages of viral DNA replication. The viral double-stranded DNA binding protein p6 overcomes the initiation and transition defects of these mutant TPs. In addition, it has been determined that the TP N-terminal domain is necessary for an efficient binding to the DNA polymerase as well as for TP-DNA amplification *in vitro*. On the whole, these results allow us to propose a role of the TP N-terminal domain in the recognition and unwinding of the replication origin.



# Introducción

---





Tradicionalmente las bacterias han sido consideradas como organismos carentes de organización intracelular, siendo concebidas como una “bolsa de enzimas” en las que las macromoléculas se distribuían de manera aleatoria. Esta visión era debida a que las bacterias son lo suficientemente pequeñas como para considerar los procesos de difusión como dominantes, y a la ausencia en la mayoría de ellas de organelos rodeados de membrana, careciendo por tanto de una compartimentación intracelular. Sin embargo, esta visión ha ido cambiando con el tiempo a medida que se han ido acumulando evidencias experimentales que la contradicen, gracias en gran medida al desarrollo y mejora de técnicas de microscopía de fluorescencia. Al igual que ocurre en los organismos eucariotas, las proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares bacterianos presentan localizaciones intracelulares específicas. Esta localización es dinámica, pudiendo cambiar con la fase del ciclo celular o debido a las condiciones ambientales. Como consecuencia de esta organización, la replicación de los virus que infectan bacterias (bacteriófagos) también se da en sitios intracelulares específicos. Asimismo, puesto que han co-evolucionado con sus hospedadores, los virus han desarrollado mecanismos diversos para aprovechar estructuras y recursos de la bacteria infectada.

### 1. La bacteria *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* es una bacteria del género *Bacillus*, con forma bacilar, Gram-positiva, que crece generalmente en el suelo, asociada con el sistema radicular de plantas y con material vegetal en descomposición (Siala *et al.*, 1974; Earl *et al.*, 2008), aunque también puede crecer en el tracto gastrointestinal de animales (Barbosa *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 2006; Leser *et al.*, 2008). Por tanto, aunque en origen fue considerado aerobio estricto, se ha demostrado que puede crecer en condiciones anaerobias (Glaser *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1997; Tam *et al.*, 2006).

*B. subtilis* es una bacteria que posee una gran adaptabilidad a los cambios ambientales, desarrollando diversos mecanismos en respuesta a éstos. Así, *B. subtilis* tiene la capacidad de incorporar DNA exógeno del medio mediante un estado de competencia natural (revisado en Johnston *et al.*, 2014), formar comunidades multicelulares embebidas en una matriz extracelular producida por las propias bacterias, que se conocen como *biofilms* (revisado en Vlamakis *et al.*, 2013), o permanecer en estado latente en forma de esporas altamente resistentes hasta que las condiciones ambientales se vuelven favorables para la germinación y el posterior desarrollo del ciclo vegetativo (revisado en Higgins and Dworkin, 2012 y Tan *et al.*, 2014).

Debido a la facilidad de ser crecida y transformada genéticamente, y a que es una bacteria no patógena, *B. subtilis* es un organismo muy utilizado en diferentes campos de investigación. Así, *B. subtilis* se utiliza como modelo de diferenciación celular, replicación del DNA bacteriano,

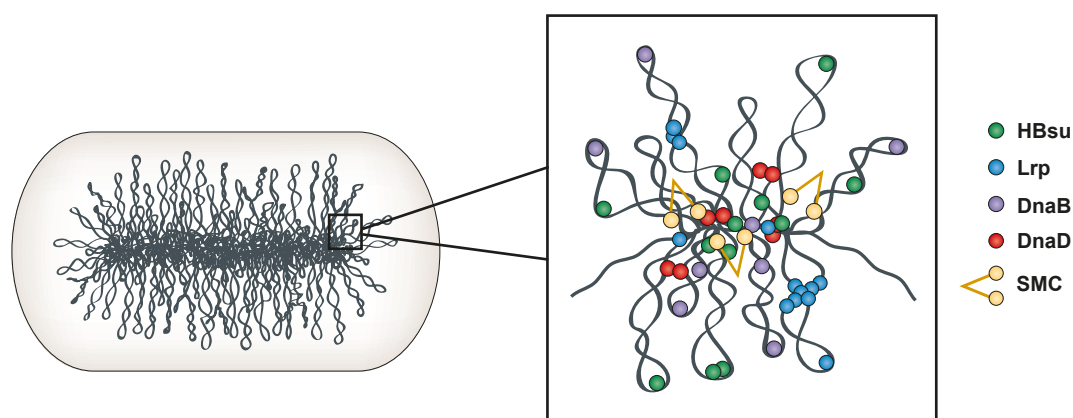
división celular y competencia. Además, la gran capacidad de secretar proteínas al medio en altas concentraciones (20-25 g/L) como antibióticos, proteasas, lipasas, amilasas y celulasas, entre otros, ha hecho que *B. subtilis* sea muy utilizado en la industria (revisado en van Dijl and Hecker, 2013).

Todas estas características han hecho que hasta el momento *B. subtilis* sea la bacteria Gram-positiva mejor caracterizada a nivel genético, bioquímico y fisiológico.

### 1.1. Organización del material genético en *B. subtilis*

*B. subtilis* tiene un genoma circular de DNA de doble cadena, de 4,2 Mpb, en el que unos 4.100 genes codifican para proteínas (Kunst *et al.*, 1997). El genoma bacteriano se encuentra embebido en el citoplasma, en una estructura nucleoproteica conocida como nucleoide (Robinov and Kellenberger, 1994). Puesto que tiene una longitud del orden de 1000 veces mayor que la célula que lo contiene, el genoma bacteriano se encuentra altamente compactado (Trun and Marko, 1998; Holmes and Cozzarelli, 2000), organizado en dominios de DNA negativamente superenrollados, topológicamente independientes entre sí (Sinden and Pettijhon, 1981; Postow *et al.*, 2004). El tamaño de estos dominios topológicos ha sido analizado en *Escherichia coli*, donde se ha propuesto que tienen un tamaño medio de unas 10 Kb (Postow *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2005). Las topoisomerasas, los procesos de transcripción y replicación, y el *crowding* molecular contribuyen a la compactación y organización global del cromosoma bacteriano (Luttinger, 1995; Espeli and Mariani, 2004; Deng *et al.*, 2005; Jin and Cabrera, 2006; Zhou *et al.*, 2008; de Vries 2010). Además, las bacterias poseen proteínas con homología funcional a las histonas eucarióticas, llamadas *histone-like proteins* o NAPs (*nucleoid-associated proteins*, por sus siglas en inglés). Éstas son pequeñas proteínas básicas que se unen al DNA con poca especificidad de secuencia, modificando su estado topológico, curvándolo, enrollándolo, o conectando diferentes regiones del cromosoma entre sí (revisado en Dillon and Dorman, 2010). Además, las NAPs regulan la transcripción de muchos genes, ya sea induciendo o reprimiendo su expresión (Dorman and Deighan, 2003; Browning *et al.*, 2010). En *B. subtilis* las principales NAPs son HBSu y Lrp (Micka and Marahiel, 1992; Kohler and Marahiel, 1997; Beloin *et al.*, 2003; Dillon and Dorman 2010). Además, las proteínas DnaB y DnaD, esenciales para la iniciación de la replicación del genoma en *B. subtilis*, también están implicadas en la organización y condensación global del cromosoma, presentando acciones similares a las NAPs de *E. coli* HU y H-NS, respectivamente (Zhang *et al.*, 2005). Por otra parte, la proteína SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*, por sus siglas en inglés), junto con las proteínas ScpA y ScpB, forma un complejo que está implicado en la organización, compactación y segregación del cromosoma bacteriano, uniéndose a lo largo de todo el genoma en *B. subtilis* (Britton *et al.*, 1998; Moriya *et al.*, 1998; Lindow *et al.*, 2002a; 2002b; Mascarenhas *et al.*, 2002; Soppa *et al.*,

2002; Volkov *et al.*, 2003). Las proteínas SMC se encuentran altamente conservadas, desde bacterias a humanos (Nasmyth y Haering, 2005; Hirano, 2006). Las topoisomerasas, las NAPs y el complejo SMC, mantienen los dominios topológicos del cromosoma, regulando el número y tamaño de éstos (Wang *et al.*, 2013) (**Figura 1**). Sin embargo, estos dominios y sus fronteras no son estáticos, sino que son altamente dinámicos, cambiando en respuesta a las transacciones del DNA que ocurren en y entre ellos. Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de transcripción es un factor importante que influye en la topología del nucleóide. El movimiento de la RNA polimerasa a lo largo de la cadena molde genera dominios de superenrollamiento positivo y negativo, por delante y por detrás, respectivamente, de la burbuja transcripcional (Wu *et al.*, 1988; Rahmouni and Wells, 1992). De manera similar, el proceso de transcripción (transcripción asociada a la traducción e inserción en la membrana bacteriana del polipéptido nascente) se ha propuesto que influenciaría la estructura del nucleóide (Woldringh, 2002; Libby *et al.*, 2012; Fishov and Norris 2012). La estructura del nucleóide, a su vez, impone una compartimentación sobre la célula, restringiendo la difusión de macromoléculas (Montero Llopis *et al.*, 2010).



**Figura 1: Organización del cromosoma de *B. subtilis*.** Representación esquemática de la organización topológica del nucleóide bacteriano y de las diferentes proteínas asociadas a éste en *B. subtilis*. Figura adaptada de Wang *et al.*, 2013.

El primer estudio citológico llevado a cabo con el objeto de determinar la posición subcelular de un *locus* del genoma bacteriano se llevó a cabo en *B. subtilis* (Webb *et al.*, 1997). Así, mediante experimentos de microscopía de fluorescencia, se trazaron las posiciones genómicas correspondientes al *oriC* y *Ter* en la célula, mostrando que al inicio del ciclo celular estas posiciones localizan en polos celulares opuestos (Webb *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1998). Estos estudios revelaron que la replicación se inicia cerca de la región central de la célula, y que los nuevos orígenes replicados se segregan rápidamente hacia los extremos externos del nucleóide. La región del *Ter* ocupa posiciones celulares centrales durante la mayoría del ciclo celular (Webb *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1998). Asimismo, Teleman y colaboradores (Teleman *et al.*, 1998), trazaron 4 posiciones genómicas (90°, 181°, 270° y 359°) en

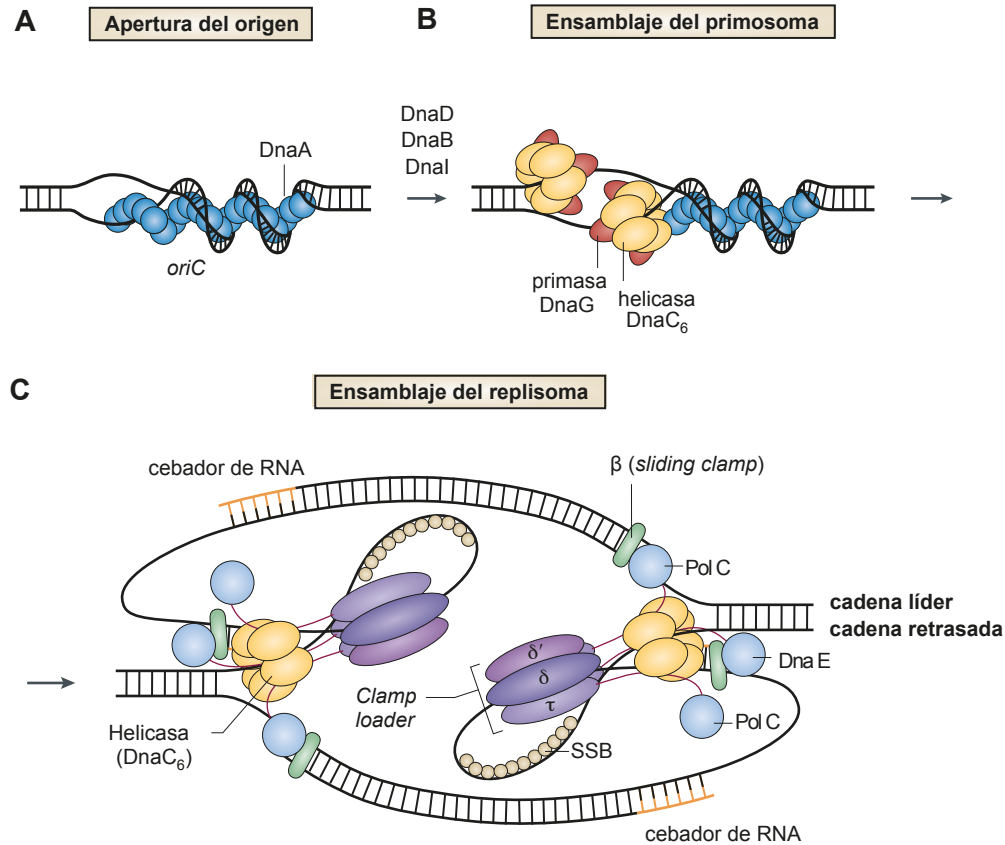
el cromosoma de *B. subtilis* y vieron que los *loci* que tienen posiciones intermedias entre el *oriC* y el *Ter* en el mapa genético, localizan en la célula en posiciones intermedias entre ambas regiones. Estos datos revelan una recapitulación intracelular del mapa genético, que se traduce en un posicionamiento específico del cromosoma dentro de la bacteria. Por otra parte, Lewis y colaboradores (Lewis *et al.*, 2000) mostraron que la RNA polimerasa de *B. subtilis* colocaliza mayoritariamente con el nucleóide, y que, por el contrario, los ribosomas quedan excluidos por éste.

### 1.2. Replicación del material genético en *B. subtilis*

#### 1.2.1. Iniciación de la replicación en *B. subtilis*

La replicación del genoma en *B. subtilis* comienza en un sitio único denominado origen de replicación (*oriC*) (Yoshikawa and Sueoka, 1963a, 1963b; revisado en Lemon *et al.*, 2002). En la **Figura 2** se muestra una representación esquemática de la iniciación y elongación de la replicación del genoma de *B. subtilis*. Para iniciar la replicación, la proteína DnaA se une a secuencias específicas en el *oriC* (cajas *DnaA*) (Moriya *et al.*, 1985; Fukuoka *et al.*, 1990) y produce la separación de las dos cadenas de DNA en una región rica en AT denominada DUE (*DNA unwinding element*, por sus siglas en inglés) (Krause *et al.*, 1997; revisado en Mott and Berger, 2007). En esta región del origen de replicación se generarán dos horquillas de replicación que procederán bidireccionalmente a lo largo del cromosoma circular. En primer lugar se produce el ensamblaje del primosoma, en el que la helicasa replicativa, DnaC (que es ensamblada con la ayuda de las proteínas DnaD, DnaB y DnaI) (Velten *et al.*, 2003; Rokop *et al.*, 2004), desenrolla y expande la burbuja de ssDNA generada por la proteína DnaA, para permitir la entrada de la primasa (DnaG). Una vez que la primasa ha sintetizado el *primer* o cebador de RNA se ensamblan de manera sucesiva los componentes del replisoma (complejo de proteínas y enzimas encargadas de la elongación de la replicación): la abrazadera deslizante o *sliding clamp* ( $\beta$ ), las proteínas encargadas de posicionar la abrazadera deslizante o *clamp loader* ( $\tau$ ,  $\delta$ ,  $\delta'$ ), la proteína de unión a DNA de banda sencilla o SSB y las polimerasas replicativas PolC y DnaE. Ambas polimerasas llevan a cabo la replicación del DNA en *B. subtilis*. Inicialmente se propuso que PolC sería la polimerasa responsable de la síntesis de la cadena líder y DnaE responsable de la síntesis de la cadena retrasada (Dervyn *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha descrito recientemente que DnaE actúa primero extendiendo los *primers* de RNA en la cadena retrasada y PolC continúa posteriormente con la elongación de esta cadena (Sanders *et al.*, 2010). Finalmente, la DNA polimerasa I elimina los segmentos de RNA y sintetiza DNA en su lugar, siendo estos fragmentos posteriormente sellados por la acción de la DNA ligasa (Kornberg and Baker, 1992). La proteína SSB, aparte de su papel en la estabilización de las regiones de ssDNA, tiene un papel central en el reclutamiento de proteínas a la horquilla de replicación. Se ha determinado

que esta proteína mantiene una red de interacciones que incluye al menos 12 proteínas implicadas en replicación, reparación y recombinación (Costes *et al.*, 2010). Cabe destacar que el replisoma de *B. subtilis* ha sido reconstituido *in vitro* utilizando 13 proteínas purificadas (DnaB, DnaC, DnaD, DnaG, DnaI, SSB, PolC, DnaE, PriA,  $\beta$ ,  $\tau$ ,  $\delta$  y  $\delta'$ ), dando lugar a una horquilla de replicación funcional en un molde de DNA circular (Sanders *et al.*, 2010).



**Figura 2: Representación esquemática de la iniciación y elongación de la replicación del genoma en *B. subtilis*.** (A) Para iniciar la replicación, la proteína DnaA se une a secuencias específicas en el *oriC* y produce el desenrollamiento de una región rica en AT, generando los sustratos de ssDNA necesarios para el ensamblaje del primosoma. (B) En primer lugar, las proteínas DnaD, DnaB y DnaI ayudan a que dos helicasas replicativas (DnaC) se ensamblen en las cadenas de ssDNA que serán las cadenas retrasadas de ambas horquillas de replicación. A continuación, la helicasa expande la burbuja de ssDNA, permitiendo la acción de la primasa, que sintetizará el cebador de RNA para que sea utilizado por las polimerasas replicativas. (C) Finalmente, se ensamblan el resto de componentes del replisoma en ambas horquillas de replicación, que procederán bidireccionalmente a lo largo del cromosoma circular hasta que ambas horquillas converjan en los sitios *Ter* del genoma. Figura adaptada de Robinson and van Oijen, 2013.

Se ha propuesto que la iniciación de la replicación en *B. subtilis* estaría asociada a la membrana plasmática, ya que las regiones correspondientes al *oriC* se encuentran enriquecidas en la fracción celular de membrana (Sueoka and Hammers, 1974; Yamaguchi and Yoshikawa, 1977; Winston and Sueoka, 1980; Sueoka 1998). Esta asociación tendría lugar a través de la proteína DnaB, que anclaría el *oriC* a la membrana plasmática (Winston and Sueoka, 1980; Sueoka 1998; Rokop *et al.*, 2004) y reclutaría a la proteína DnaD, regulando de esta manera el inicio de la replicación (Rokop *et al.*, 2004).

La visualización de la polimerasa replicativa PolC fusionada a GFP, así como de otros componentes del replisoma ( $\tau$ -GFP,  $\delta'$ -GFP) en células de *B. subtilis* reveló una localización subcelular en sitios discretos, principalmente en el centro de la célula (Lemon and Grossman, 1998). Debido a esta localización subcelular discreta, se propuso que ambos replisomas podrían estar anclados a alguna estructura subcelular, dando lugar a una “fábrica” de replicación por la cual pasaba el DNA procedente de ambas horquillas para ser replicado (Lemon and Grossman, 1998). Sin embargo, experimentos posteriores de *time-lapse* han mostrado que esta “fábrica” no se encuentra fija en una posición determinada, sino que se mueve por el centro celular (Migocki *et al.*, 2004). Así, se vió que un *focus* de GFP-PolC se separa en dos *foci*, que vuelven a converger otra vez, lo que sugiere que los dos replisomas son capaces de separarse durante la replicación (Migocki *et al.*, 2004). En línea con estos resultados, trabajos más recientes tanto en *E. coli* como en *B. subtilis* sugieren un modelo en el que los replisomas se mueven a lo largo del cromosoma para dar lugar a la replicación de éstos (Reyes-Lamothe *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014).

### 1.2.2. Terminación de la replicación en *B. subtilis*

La terminación de la replicación en *B. subtilis* tiene lugar cuando las horquillas de replicación convergen en sitios aproximadamente opuestos al *oriC* en el mapa circular del genoma, en los denominados sitios *Ter*. Estos sitios son secuencias de 30 pb que constan de 2 repeticiones invertidas imperfectas de 16 pb (llamadas sitio A y B) que solapan en un trinucleótido conservado. En el genoma de *B. subtilis* hay 9 sitios *Ter* que abarcan una región de unas 430 Kb en la región del término (Griffiths *et al.*, 1998). A cada uno de los sitios *Ter* se une un dímero de la proteína RTP (*replication termination protein*, por sus siglas en inglés) (Lewis *et al.*, 1990; Vivian *et al.*, 2007). La unión de la proteína RTP a los sitios *Ter* actúa como una trampa para el avance de las horquillas de replicación, restringiendo de esta manera la fusión de las horquillas a la región de terminación del genoma. Cada complejo *Ter*-RTP sólo puede producir la parada de la horquilla de replicación que procede desde una dirección y no la de la horquilla que procede desde la dirección contraria; por ello, se dice que el complejo de terminación posee polaridad funcional (Griffiths *et al.*, 1998). El sitio A es un sitio de unión de baja afinidad para el dímero de RTP y el sitio B es un sitio de unión de alta afinidad. Para que se produzca la parada de la horquilla de replicación ambos sitios deben estar ocupados por dímeros de RTP (Duggin *et al.*, 1999) y la horquilla tiene que encontrarse en primer lugar con el sitio B. Así, cuando la horquilla de replicación se encuentra en primer lugar con el sitio A, ésta desplaza a RTP y es capaz de atravesar el sitio de terminación (Smith y Wake, 1992). Además, se ha propuesto que el dímero de RTP unido al sitio B establecería interacciones con algún componente del replisoma, probablemente la helicasa replicativa, siendo esta interacción crítica para bloquear el avance de la horquilla de replicación (Manna *et al.*, 1996; Gautam *et al.*, 2001; Duggin *et al.*, 2006).



Finalmente, la terminación se completa con la decatenación por parte de la topoisomerasa IV de los dos cromosomas entrelazados y la resolución por parte de recombinasas específicas (RipX y CodV) de los posibles dímeros de cromosomas formados durante el proceso de replicación (Huang *et al.*, 1998; Sciochetti and Pigot, 2000). Ambos procesos son coordinados y facilitados por las translocasas SftA y SpoIIIE para permitir una segregación eficiente de la región terminal del cromosoma (Sharpe and Errington, 1995; Biller and Burkholder, 2009; Kaimer *et al.*, 2009).

### 1.3. Segregación del cromosoma en *B. subtilis*

La segregación del cromosoma en *B. subtilis* ocurre de manera simultánea a la replicación (revisado en Wang *et al.*, 2013; Kleckner *et al.*, 2014), y al igual que ésta sigue la dirección *ori-ter*. Por tanto, los diferentes *loci* son segregados por orden de replicación. Este proceso coordinado de replicación y segregación simultánea no sólo restablece el posicionamiento de los cromosomas con respecto a la célula (patrón espacial) sino también la organización intrínseca del cromosoma (Wang and Rudner, 2014).

En ausencia de un control temporal de la segregación (a diferencia de lo que ocurre en eucariotas), las bacterias se valen de la organización espacial para promover una segregación fiel y eficiente del cromosoma. Por tanto, los factores que organizan y compactan el cromosoma bacteriano afectan de manera indirecta la segregación de éste, como las NAPs, las topoisomerasas y la RNA polimerasa, entre otros (Dworkin and Losick 2002; Woldringh and Nanninga 2006; Wang *et al.*, 2013). Se piensa que no existe una única maquinaria dedicada a la segregación del cromosoma en bacterias, estando implicados en este proceso diferentes factores que se detallan a continuación.

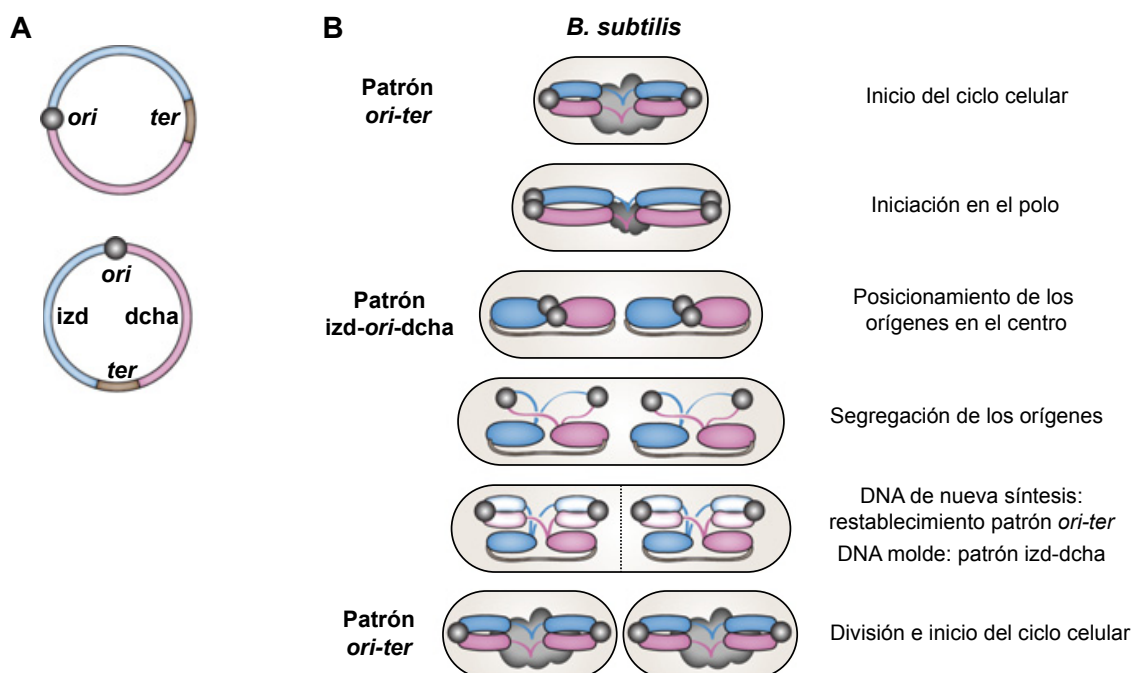
La mayoría de los cromosomas procarióticos poseen complejos de partición *parABS*, descritos inicialmente en plásmidos de bajo número de copias (Livny *et al.*, 2007; Salje *et al.*, 2010). Estos complejos consisten en tres componentes: unas secuencias de DNA que actuarían de manera análoga a un centrómero (secuencias *parS*), agrupadas en la región del origen de replicación, una proteína que se une específicamente a esta secuencia (*parB*, denominada SpoOJ en *B. subtilis*) y una ATPasa tipo Walker (*parA*, denominada Soj en *B. subtilis*) que actúa sobre este complejo. En *B. subtilis*, tanto SpoOJ como Soj son importantes para la segregación de los orígenes hacia los polos celulares (Lee and Grossman, 2006). Además, la delección de la proteína SpoOJ, da lugar a un aumento de la producción de células anucleadas de 100 veces con respecto a la estirpe *wild-type* (Ireton *et al.*, 1994).

El complejo SMC también juega un papel importante en la segregación del cromosoma en *B. subtilis*. La delección de SMC o de sus proteínas asociadas ScpA y ScpB, es deletérea en condiciones de crecimiento rápido. Además, en condiciones de crecimiento lento los mutantes de delección tienen

## Introducción

nucleoides descondensados y una mayor frecuencia de células anucleadas, lo que sugiere que SMC ejerce su función sobre todo el cromosoma (Grauman 2001; Mascarenhas *et al.*, 2002; Soppa *et al.*, 2002). El complejo SMC es necesario para la separación de los orígenes y de ambos brazos del cromosoma tras su replicación (Gruber *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014b). Por otra parte, la proteína SpoOJ recluta a la proteína SMC al origen, acción que se requiere para una correcta segregación del cromosoma (Gruber and Errington, 2009; Sullivan *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014a).

Se han observado dos tipos distintos de organización del cromosoma bacteriano: *ori-ter* e izquierda-*ori*-derecha (Viollier *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2006; Vallet-Gely and Boccard, 2013; David *et al.*, 2014). En el patrón *ori-ter* (Figura 3A), el origen se sitúa en un polo celular y el término en el polo opuesto, mientras que el brazo izquierdo y el derecho se sitúan en paralelo, siguiendo el eje longitudinal de la célula. En el patrón izquierda-*ori*-derecha el origen se posiciona en el centro de la célula y ambos brazos flanquean al origen en ambas mitades de la célula, cerrando el círculo la región del término, que conecta ambos brazos. Recientemente, Wang y colaboradores (Wang *et al.*, 2014a) determinaron que *B. subtilis* presenta un patrón *ori-ter* durante la mayoría del ciclo celular, pero los



**Figura 3: Segregación del DNA en *B. subtilis*.** (A) Diferentes patrones [*ori-ter* e izquierda(*izd*)-*ori*-derecha(*dcha*)] que puede adoptar el nucleoide bacteriano. (B) Representación esquemática de la segregación del DNA en *B. subtilis*. Al inicio del ciclo celular los orígenes de replicación (esferas grises) se localizan cerca de los polos celulares y el término ocupa el polo opuesto (lo que tras la división será el nuevo polo celular), adoptando el patrón longitudinal *ori-ter-ter-ori*. En esta localización polar se produce la duplicación de los orígenes, tras la cual migran de forma conjunta hacia el centro de la célula, dando lugar al patrón de organización izquierda-*ori*-derecha en el que ambos brazos del cromosoma (representados en color azul el brazo izquierdo y en color rosa el brazo derecho) ocupan ambas mitades de la célula. Los orígenes duplicados empiezan a segregarse en direcciones opuestas hacia los polos celulares, seguidos por el resto de las regiones replicadas del cromosoma. Así, durante la segregación comienza a restablecerse el patrón *ori-ter*, que será con el que las células hijas inicien un nuevo ciclo celular tras la división. Figura adaptada de Wang *et al.*, 2014.

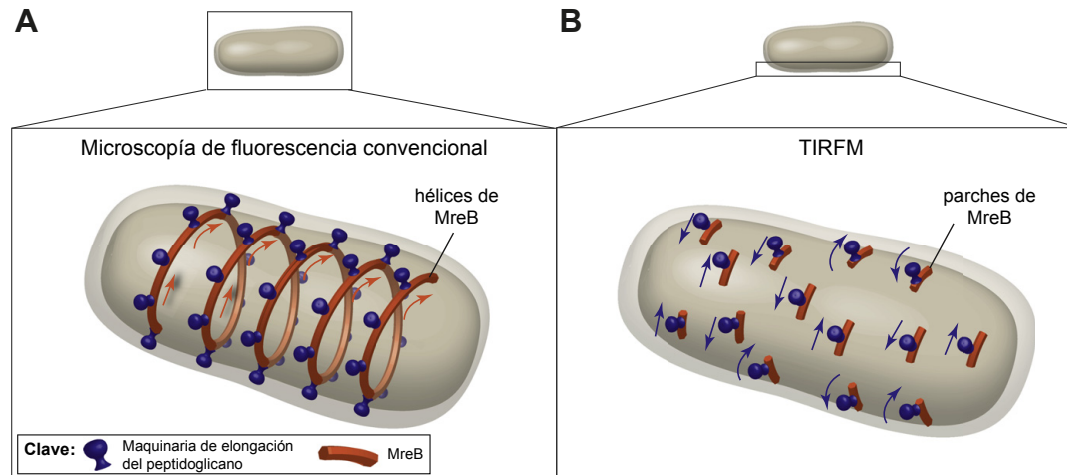


orígenes se posicionan en la región central de la célula justo después de replicarse en los extremos del nucleoide (cerca de los polos), dando lugar al patrón izquierda-*ori*-derecha. Una vez posicionados en la región central de la célula, los orígenes son segregados hacia los polos celulares mientras continúa la replicación, lo que restablece el patrón *ori-ter* inicial (**Figura 3B**). Este estudio demostró que, incluso en condiciones de crecimiento lento, *B. subtilis* inicia el ciclo celular con cromosomas parcialmente replicados, siendo por tanto parcialmente diploide. Además, Wang y colaboradores (2014a) mostraron que el sistema de partición *parS*/SpoOJ/Soj y el complejo SMC determinan los patrones específicos que adopta el cromosoma de *B. subtilis* durante el ciclo celular. El complejo SMC es necesario para mantener el patrón izquierda-*ori*-derecha, ya que cuando este complejo es inactivado la orientación del cromosoma cambia, generando el patrón *ori-ter*. Asimismo, el sistema de partición *parS*/SpoOJ/Soj está implicado en la generación del patrón *ori-ter*. En ausencia de Soj, el movimiento de los orígenes hacia los polos celulares no se produce y la reorganización del cromosoma se ve afectada (Wang *et al.*, 2014a).

Por otra parte, diferentes estudios han propuesto que la proteína MreB, homólogo bacteriano de la actina eucariótica, implicado en la determinación de la forma celular y la síntesis de la pared celular bacteriana, podría participar en la segregación del cromosoma, tanto en *B. subtilis* como en otras bacterias (Soufo and Graumann, 2003; Gitai *et al.*, 2004; revisado en Shaevitz and Gitai, 2010). Sin embargo, esta afirmación sigue siendo controvertida hoy día, ya que en diferentes condiciones MreB parece no ser esencial para este proceso (Formstone and Errington, 2005; Bendezú and de Boer, 2008; Schirner and Errington, 2009; Shebelut *et al.*, 2009). Los primeros estudios de la localización de proteínas MreB en *B. subtilis* mediante técnicas de inmunofluorescencia y fusiones a GFP, mostraron que MreB, Mbl y MreBH forman largas estructuras helicoidales a lo largo del eje longitudinal de la bacteria, cerca de la membrana celular (Jones *et al.*, 2001; Carballido-López *et al.*, 2006a) (**Figura 4A**). Puesto que el patrón de localización de proteínas PBPs (*penicillin binding proteins*, por sus siglas en inglés), encargadas de la síntesis del peptidoglicano, y el patrón de inserción de nuevo peptidoglicano es helicoidal (Daniel and Errington, 2003; Tiyanont *et al.*, 2006; Divakaruni *et al.*, 2007), se postuló que los filamentos helicoidales de MreB asociados a la membrana celular actuarían como un andamio que dirigiría el crecimiento de la pared celular mediante el posicionamiento de las enzimas implicadas en su síntesis (revisado en Carballido-López *et al.*, 2006b). Sin embargo, estudios más recientes utilizando la técnica de microscopía de fluorescencia de alta resolución TIRFM (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*, por sus siglas en inglés), que permite detectar con gran sensibilidad eventos que tienen lugar en la superficie celular, y el seguimiento de partículas individuales, sugieren que las proteínas MreB, Mbl y MreBH fusionadas a GFP no forman estructuras helicoidales continuas sino parches discretos en la periferia celular, que se mueven perpendicularmente al eje longitudinal de la célula (Domínguez-Escobar *et al.*, 2011; Garner *et al.*, 2011) (**Figura 4B**). En este estudio además se mostró que el movimiento de estos parches depende de la maquinaria de síntesis de la pared celular, ya

## Introducción

que la inhibición de ésta con antibióticos o la delección de proteínas implicadas en este proceso bloquean su movimiento.



**Figura 4: Localización subcelular de los componentes del citoesqueleto tipo actina bacteriano en *B. subtilis*, utilizando técnicas de microscopía de fluorescencia convencional (A) o la técnica de TIRFM (B).** Tanto en (A) como en (B) se representa la proteína MreB (en naranja) asociada a la maquinaria de síntesis del peptidoglicano (en violeta). Las flechas indican el movimiento de las estructuras formadas por MreB y la maquinaria de síntesis del peptidoglicano. Figura adaptada de White and Gober, 2012.

Finalmente, se ha propuesto que las cromátidas hermanas tenderían a separarse de forma natural debido a fuerzas entrópicas. Así, se ha sugerido que las cromátidas replicadas se comportarían como polímeros confinados en un contenedor cilíndrico, que se repelerían entre sí, lo que promovería su segregación (revisado en Jun and Wright, 2010).

## 2. El bacteriófago $\phi 29$

El bacteriófago  $\phi 29$  es un virus perteneciente a la familia *Podoviridae* (fagos con cola corta no contráctil), dentro del orden *Caudovirales* (fagos con cola), y al género de los fagos  $\phi 29$ -like, en el que se encuentra junto con los fagos  $\phi 15$ , PZA, BS32, B103, Nf, M2Y y GA-1 (Ackermann *et al.*, 1998). Éstos son los fagos más pequeños que infectan *Bacillus* y están entre los fagos más pequeños conocidos que poseen un genoma de dsDNA (Anderson and Reilly, 1993). Desde su descubrimiento (Reilly and Spizizen, 1965), el bacteriófago  $\phi 29$  ha constituido un sistema modelo muy utilizado en Biología Molecular, permitiendo el estudio de procesos básicos como la replicación y la transcripción del material genético, así como la morfogénesis del virión (Meijer *et al.*, 2001a).  $\phi 29$  infecta la bacteria *B. subtilis*, desarrollando un ciclo lítico de aproximadamente 45 min a 37 °C en condiciones de laboratorio. Por otro lado, se ha demostrado que  $\phi 29$  puede permanecer en un estado de pseudo-latencia al ser capaz de atrapar su genoma en la espora (Meijer *et al.*, 2005), aplazando así el desarrollo de su ciclo lítico hasta que las condiciones ambientales vuelvan a ser favorables para el desarrollo vegetativo de su hospedador.

## 2.1. Organización genética y transcripcional del DNA del bacteriófago $\phi$ 29

El bacteriófago  $\phi$ 29 posee un genoma de DNA lineal de doble cadena de 19.285 pb, con una proteína terminal (TP) covalentemente unida a los extremos 5' del DNA (Salas *et al.*, 1978), y codifica unas 20 proteínas.

La transcripción del genoma de  $\phi$ 29 es un proceso altamente controlado que tiene lugar en dos etapas, según el periodo del ciclo infectivo en el que ocurre la transcripción: temprana y tardía. La transcripción del genoma viral es llevada a cabo por la RNA polimerasa bacteriana y el cambio de la transcripción temprana a la tardía está regulado por proteínas virales tempranas (Sogo *et al.*, 1979). Por regla general, en los fagos, los genes con funciones similares están agrupados en el mismo operón para poder ser regulados con la máxima economía (Ackerman *et al.*, 1998). Así, el genoma de  $\phi$ 29 presenta sus genes agrupados en tres operones, dos operones de expresión temprana localizados en los extremos del genoma y un operón de expresión tardía localizado entre los dos operones de expresión temprana (**Figura 5**).

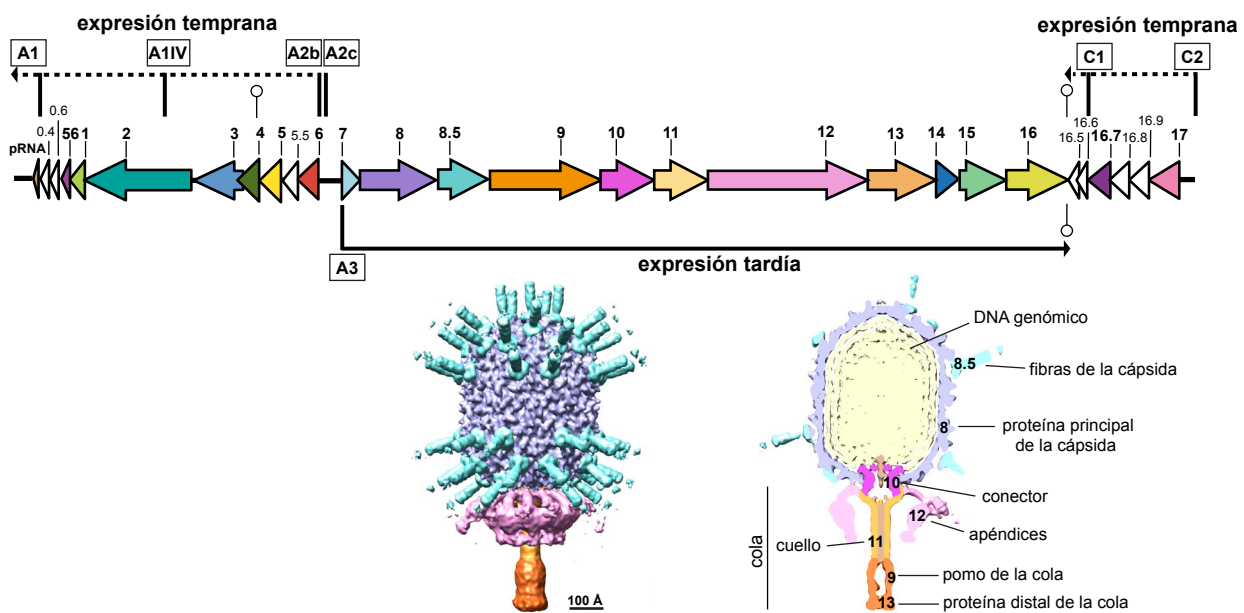
El operón derecho se transcribe principalmente a partir del promotor denominado C2 y codifica las proteínas p16.7 y p17, implicadas en la inyección del genoma viral y la replicación (González-Huici *et al.*, 2004a, 2006; Alcorlo *et al.*, 2007; Meijer *et al.*, 2000; Meijer *et al.*, 2001b; Serna-Rico *et al.*, 2003). Además, contiene cuatro fases de lectura abierta (16.5, 16.6, 16.8 y 16.9) cuya función se desconoce, que podrían codificar otras proteínas. El operón derecho es el primero en transcribirse, incluso antes de que se lleve a cabo la inyección completa del genoma viral (González-Huici *et al.*, 2004a) (ver apartado 2.3).

El operón izquierdo codifica las principales proteínas implicadas en la replicación del DNA viral y las proteínas implicadas en la regulación de la transcripción (p1, p2, p3, p4, p5 y p6), así como la proteína p56, que es un inhibidor de la uracil-DNA glicosilasa (UDG) bacteriana (Serrano-Heras *et al.*, 2008; Pérez-Lago *et al.*, 2011). Además, contiene tres fases de lectura abierta que podrían codificar otras proteínas (0.4, 0.6 y 5.5). El gen 2 codifica la proteína p2, que es la DNA polimerasa viral y el gen 3 codifica la p3 o TP, que es la proteína que sirve como cebadora durante la iniciación de la replicación (Peñalva and Salas, 1982; Blanco and Salas, 1984). Los genes 5 y 6 codifican, respectivamente, la proteína p5 o SSB, que es una proteína de unión a DNA de banda sencilla (ssDNA) (Martin *et al.*, 1989), y la proteína p6 o DBP, que se une a DNA de banda doble (dsDNA) (Prieto *et al.*, 1988). La proteína p6 forma un complejo nucleoproteico en los orígenes de replicación para activar la iniciación de la replicación del DNA viral (Serrano *et al.*, 1993). El gen 4 codifica el regulador transcripcional p4, que produce el cambio de la transcripción del operón temprano izquierdo a partir de los promotores A2b y A2c a la transcripción del operón tardío a partir del promotor A3 (Sogo *et al.*, 1979), y el gen 1 codifica la proteína de unión a membrana p1 (Bravo and Salas 1997), que interacciona con la proteína FtsZ y

## Introducción

cuya expresión da lugar a un aumento de la longitud celular y del DNA viral sintetizado (Ballesteros-Plaza *et al.*, 2013). Además, a partir del promotor A1, el cual es activo durante todo el ciclo infectivo (Monsalve *et al.*, 1995), se transcribe un RNA de 117 nucleótidos llamado pRNA necesario para el empaquetamiento del genoma viral en la cápsida (revisado en Schwartz and Guo, 2013).

Finalmente, el operón tardío situado en la parte central del genoma viral contiene los genes 7 al 16, que codifican las proteínas estructurales del fago, las implicadas en la morfogénesis del fago y las responsables de la lisis de la bacteria (revisado en Meijer *et al.*, 2001a). Este operón se encuentra bajo el control de un único promotor (A3) y necesita la proteína p4 para su activación (Nuez *et al.*, 1992).



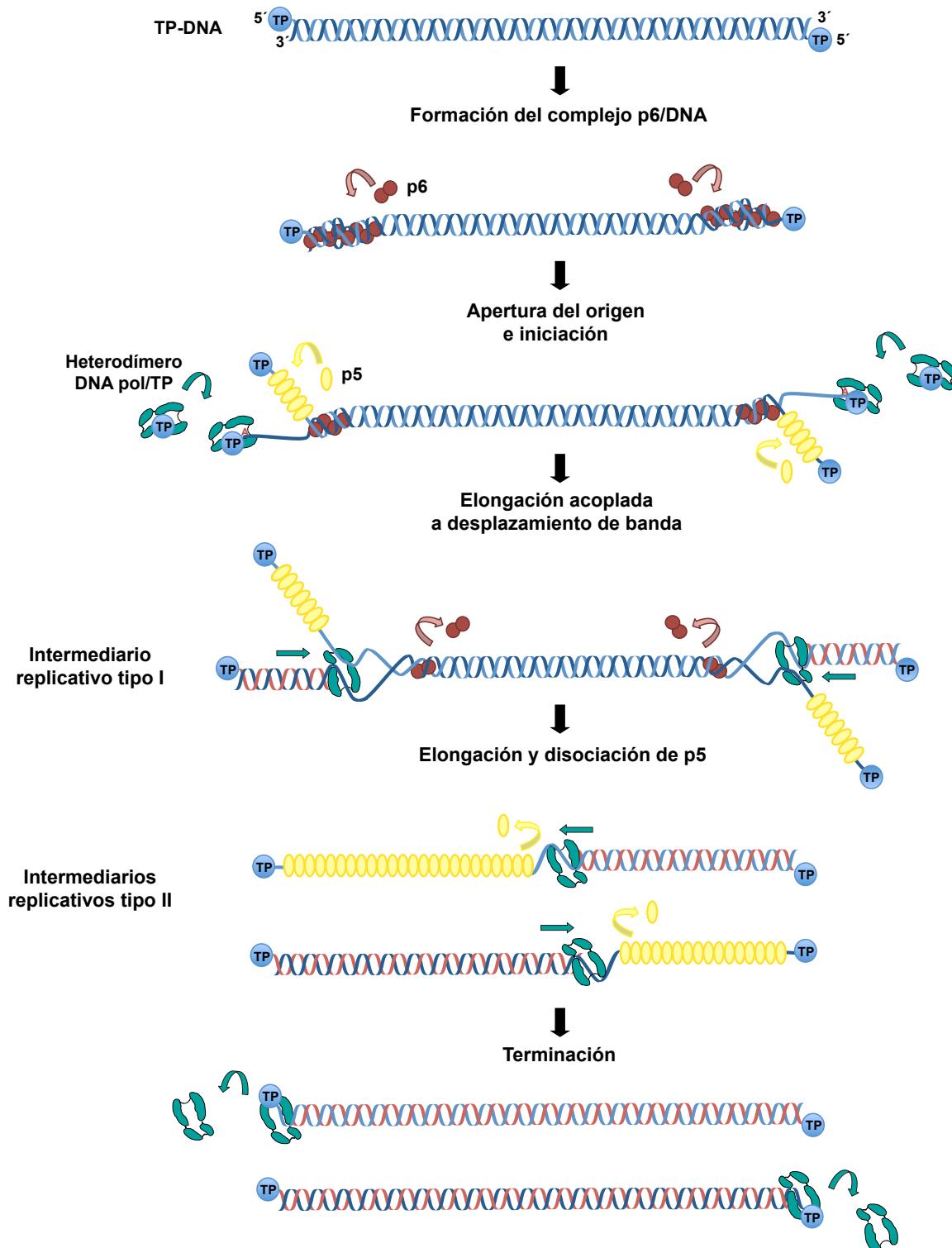
**Figura 5: Mapa genético y transcripcional de  $\phi 29$ .** A ambos extremos se presentan los operones de expresión temprana (líneas discontinuas) y entre ambos el operón de expresión tardía (línea continua). Se muestran los promotores más importantes, indicados por su nombre en cajas y los terminadores de la transcripción indicados mediante horquillas. Las flechas coloreadas corresponden a genes, mientras que las flechas blancas corresponden a fases de lectura abierta. El nombre de los genes y de las fases de lectura abierta se indica encima de cada flecha. Las flechas negras indican la dirección de la transcripción. Debajo del operón de expresión tardía se muestra un modelo del virión de  $\phi 29$ , así como un corte longitudinal de éste, con las proteínas que lo componen indicadas (adaptado de Xiang *et al.*, 2008).

La regulación de la transcripción del genoma de  $\phi 29$  ha sido ampliamente estudiada (revisado en Rojo *et al.*, 1998; Meijer *et al.*, 2001a), siendo la proteína p4 la principal implicada en este proceso. La función principal de p4 es provocar el cambio de la expresión temprana a partir de los promotores A2b y A2c a la tardía, reprimiendo la activación de estos promotores y activando el promotor A3 mediante la estabilización de la unión de la RNA polimerasa bacteriana a éste (Nuez *et al.*, 1992). Además de la p4, la proteína p6 participa en el cambio de la expresión temprana a la tardía estabilizando la unión de la proteína p4 a estos promotores (Elías-Arnanz and Salas, 1999; Camacho and Salas, 2001a, Calles *et al.*, 2002; Camacho and Salas, 2004). Por otra parte, la proteína p6 inhibe la transcripción a partir del promotor C2 uniéndose a él, ya que tiene mayor afinidad por los extremos del DNA viral (Whiteley, 1986; Barthelemy *et al.*, 1989; Camacho and Salas, 2001b; González-Huici *et al.*, 2004b).

## 2.2. Replicación del DNA del bacteriófago $\phi 29$ *in vitro*: mecanismo de replicación iniciada con TP

Generalmente, las DNA polimerasas no son capaces de iniciar la síntesis de DNA *de novo*, sino que requieren la presencia de un *primer* o cebador que contenga un grupo hidroxilo (OH) libre para iniciar la replicación. En la mayoría de los casos, este grupo OH es suministrado por *primers* de RNA sintetizados por primasas (revisado en Frick and Richardson, 2001). Sin embargo, en el caso de los organismos que contienen genomas lineales, la eliminación del *primer* de RNA provocaría un acortamiento progresivo de los extremos del genoma en sucesivas rondas de replicación. Por tanto, para garantizar la replicación de los extremos del DNA de genomas lineales, han surgido diferentes estrategias a lo largo de la evolución. Así, fagos como T4, T7 y SPP1 producen concatémeros haciendo uso de repeticiones terminales del genoma, y el fago  $\lambda$  circulariza su genoma y lo replica posteriormente mediante el mecanismo de círculo rodante (revisado en Salas and de Vega, 2008). En eucariotas superiores la telomerasa previene el acortamiento de los telómeros extendiendo los extremos del DNA utilizando su propio RNA como molde (Verdun and Karlseder, 2007). En el caso de los genomas lineales que contienen una TP en los extremos, el grupo OH de una serina, treonina o tirosina específica de la TP es utilizado por la DNA polimerasa para iniciar la replicación del DNA. Entre los organismos que utilizan este mecanismo de replicación iniciado con TP se encuentran diversos virus tanto eucarióticos (adenovirus) como procarióticos ( $\phi 29$ , PRD1, Cp1) (revisado en Salas, 1991; de Jong *et al.*, 2003). Por otra parte, la presencia de TPs ha sido descrita en virus que infectan *Archaea* (Bath *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2007), algunas especies de *Streptomyces* (Chang and Cohen, 1994), plásmidos lineales de bacterias, hongos y plantas superiores (Salas, 1991; Meinhardt *et al.*, 1997; Chaconas and Chen, 2005), elementos transponibles (Kapitonov and Jurka, 2006) y DNA mitocondrial (Fricova *et al.*, 2010).

El mecanismo de iniciación mediante proteína terminal ha sido extensamente estudiado en el bacteriófago  $\phi 29$  (revisado en Salas *et al.*, 1999 y de Vega and Salas, 2011). El bacteriófago  $\phi 29$  posee un genoma lineal de DNA de doble cadena con una TP covalentemente unida a los extremos 5', denominada TP parental. Los orígenes de replicación del genoma se encuentran en ambos extremos y están constituidos por la TP parental así como por secuencias de 12 pb que contienen repeticiones invertidas de 6 pb (3'-TTTCAT-5') (Gutiérrez *et al.*, 1988). En la **Figura 6** se muestra un esquema del mecanismo de replicación del DNA de  $\phi 29$  *in vitro*. En primer lugar, la proteína viral p6 de unión a dsDNA se une a los extremos del DNA formando un complejo nucleoproteico que distorsiona la doble hélice y se ha propuesto que ayudaría a su apertura, facilitando el proceso de iniciación (Prieto *et al.*, 1988; Serrano *et al.*, 1994). Estos orígenes serían reconocidos a continuación por el heterodímero formado entre una molécula de TP libre (TP iniciadora) y la DNA polimerasa viral. Para iniciar la replicación, la DNA polimerasa cataliza la adición del primer nucleótido (dAMP) al grupo OH de la



**Figura 6: Representación esquemática de la replicación del genoma de  $\phi 29$  *in vitro*.** La proteína p6 forma un complejo nucleoproteico en ambos orígenes de replicación, que ayudaría a abrir la doble hélice, y que será reconocido por el heterodímero formado por la DNA polimerasa y la TP. A continuación, la DNA polimerasa cataliza la incorporación del primer dAMP a la TP. Después de la etapa de transición (no representada en la figura), la polimerasa se disocia de la TP y continúa con la elongación de ambas cadenas de manera procesiva acoplada a desplazamiento de banda, dando lugar al intermediario replicativo de tipo I. La proteína p5 se une a las bandas de ssDNA desplazadas. Cuando las dos polimerasas provenientes de ambos extremos convergen, las dos cadenas parentales se separan, generando dos intermediarios replicativos tipo II, en los que la SSB unida al ssDNA será desplazada por la DNA polimerasa durante el proceso de polimerización. Finalmente, la polimerasa se disocia del DNA al alcanzar los extremos del genoma tras la replicación del último nucleótido.



Ser232 de la TP (Blanco and Salas, 1984; Hermoso *et al.*, 1985). La formación del complejo de iniciación TP-dAMP está dirigido por el segundo nucleótido en el extremo 3' del molde (Méndez *et al.*, 1992). Una vez incorporado el primer nucleótido, mediante un mecanismo de *sliding-back*, el complejo TP-dAMP se transloca una posición hacia atrás para recuperar la información del nucleótido terminal en 3'. La segunda T del extremo 3' volverá a servir como molde para la incorporación del segundo nucleótido de la cadena naciente. La DNA polimerasa sintetiza un producto de elongación de 5 nucleótidos mientras permanece unida a la TP, experimenta cambios conformacionales durante la incorporación de los nucleótidos 6-9, y se disocia completamente de la TP tras la incorporación del décimo nucleótido (Méndez *et al.*, 1997). Tras esta etapa de transición, la DNA polimerasa continúa con la elongación del DNA de manera procesiva, que ocurre acoplada al desplazamiento de la banda que no está siendo utilizada como molde por esta DNA polimerasa. Así, debido a las características de la DNA polimerasa, la elongación ocurre en ausencia de helicasas o factores de procesividad (Blanco and Salas 1985; Blanco *et al.*, 1989). La proteína viral p5 de unión a ssDNA se une a las bandas desplazadas, protegiéndolas del ataque de nucleasas (Martin *et al.*, 1989) y previniendo la formación de estructuras secundarias y la unión no productiva de la DNA polimerasa (Soengas *et al.*, 1995).

La replicación del DNA de  $\phi 29$  se inicia en ambos extremos de manera no simultánea, dando lugar a intermediarios replicativos de tipo I (Harding and Ito, 1980; Inciarte *et al.*, 1980; Sogo *et al.*, 1982; Gutiérrez *et al.*, 1991). Estos intermediarios consisten en moléculas de DNA de cadena doble en toda su longitud con una o varias ramificaciones de DNA de cadena sencilla. Cuando las DNA polimerasas procedentes de ambos extremos se encuentran, las cadenas parentales parcialmente replicadas se separan y el intermediario replicativo tipo I da lugar a dos intermediarios replicativos tipo II físicamente separados, que consisten en moléculas en las cuales una porción del DNA comenzando por un extremo es de doble cadena y la porción de DNA que abarca hasta el extremo opuesto es de cadena sencilla (Inciarte *et al.*, 1980; Gutiérrez *et al.*, 1991) (ver **Figura 6**). La elongación de este tipo de molécula ocurre sin desplazamiento de banda y con la disociación de la proteína p5 según avanza la DNA polimerasa. Finalmente, la terminación de la replicación tiene lugar cuando la DNA polimerasa llega al extremo opuesto del DNA y se disocia de éste tras la incorporación del último nucleótido, dando lugar a la completa duplicación de las cadenas parentales.

### 2.3. Organización de la replicación del bacteriófago $\phi 29$ *in vivo*

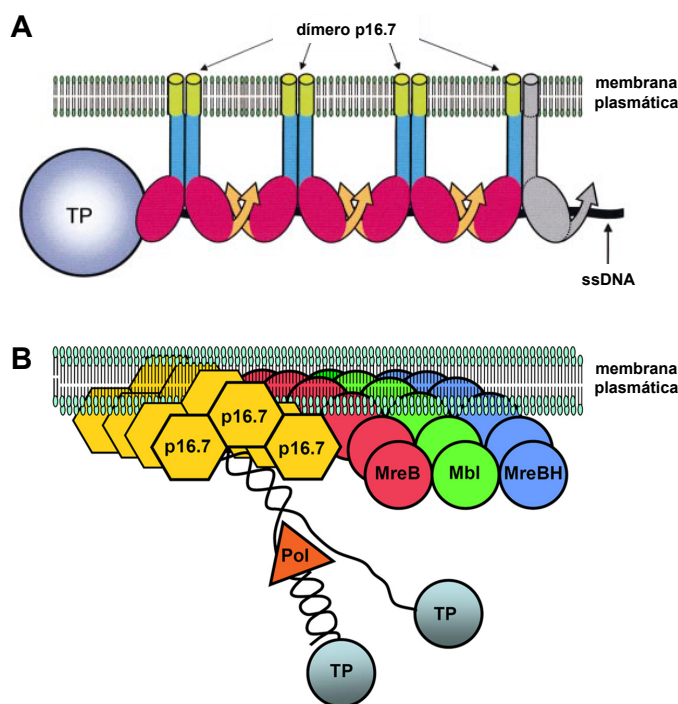
El ciclo infectivo comienza con la adsorción del virión a moléculas de la superficie celular que actúan como receptores. El bacteriófago  $\phi 29$  reconoce los ácidos teicoicos glicosilados que se encuentran formando parte de la pared celular bacteriana (Young, 1967; Moreno and Bluzat-Moreno, 1978; Villanueva and Salas, 1981). Este reconocimiento se produce mediante la proteína

p12 (Villanueva and Salas, 1981; Xiang *et al.*, 2009), que forma 12 apéndices que rodean a la región del cuello (ver **Figura 5**). Se ha propuesto que la proteína p13, situada en la parte más distal de la cola, degradaría la pared celular para permitir la inyección del genoma viral (Xiang *et al.*, 2008). La direccionalidad de la inyección del genoma ocurre de derecha a izquierda, en un proceso que tiene lugar en dos etapas. En la primera etapa se produce la inyección de aproximadamente el 65% del genoma del fago de manera pasiva, debido a la liberación de la presión generada en la cápsida por el alto grado de empaquetamiento del DNA viral (Smith *et al.*, 2001; González-Huici *et al.*, 2004a). En la segunda etapa se produce la inyección del resto del genoma viral de manera activa, la cual requiere la síntesis de proteínas codificadas por el extremo derecho del genoma, entre las cuales se sabe que participan las proteínas p16.7 y p17 (González-Huici *et al.*, 2004a, 2006; Alcorlo *et al.*, 2007). Por tanto, primero tiene lugar la transcripción del operón temprano situado en el extremo derecho del genoma viral y posteriormente la del operón temprano situado en el extremo izquierdo. Como se ha mencionado en el apartado 2.1, la RNA polimerasa bacteriana lleva a cabo la transcripción del genoma viral, con la participación del regulador transcripcional p4 y la proteína p6. Por otra parte, se ha determinado que la DNA girasa bacteriana es importante para la replicación del DNA viral *in vivo*, ya que el uso de inhibidores de esta enzima como la novobiocina y el ácido nalidíxico afectan la replicación del DNA viral (González-Huici *et al.*, 2004b).

La DNA polimerasa, la TP y las proteínas p5 y p6 son esenciales para la replicación del DNA viral *in vivo* (Talavera *et al.*, 1972; Carrascosa *et al.*, 1976; Bravo *et al.*, 1994). Aparte de la necesidad de estas proteínas, se ha demostrado la importancia de las proteínas p1, p16.7, p17 y p56 para la replicación eficiente del DNA viral *in vivo*. Así, se sabe que en ausencia de la proteína p16.7 se produce un retraso en la síntesis del DNA viral y en la distribución de éste siguiendo un patrón tipo helicoidal (Meijer *et al.*, 2000; Meijer *et al.*, 2001b; Muñoz-Espín *et al.*, 2009). La proteína p16.7 es una proteína de membrana (Meijer *et al.*, 2000, 2001b), que se une tanto a dsDNA como a ssDNA de manera inespecífica de secuencia, aunque su afinidad por ssDNA es mayor (Serna-Rico *et al.*, 2002). Además, esta proteína interacciona con la TP *in vitro* (Serna-Rico *et al.*, 2003). De esta manera, se propuso que la localización del DNA viral cerca de la membrana bacteriana podría tener lugar mediante la asociación de la proteína p16.7 con las bandas desplazadas del DNA viral o con la TP parental (Serna-Rico *et al.*, 2002; 2003) (**Figura 7A**). Por otra parte, se sabe que para que tenga lugar una replicación eficiente del DNA viral *in vivo* se necesita un citoesqueleto de actina intacto (Muñoz-Espín *et al.*, 2009). Así, en ausencia de cualquiera de las tres proteínas del citoesqueleto de actina bacteriano, MreB, Mbl o MreBH, se pierde la distribución tipo helicoidal de la DNA polimerasa viral y de la proteína p16.7 (Muñoz-Espín *et al.*, 2009). Además, mediante ensayos de doble híbrido en bacteria y de entrecruzamiento *in vivo*, se ha determinado que la proteína p16.7 interacciona con la proteína MreB (Muñoz-Espín *et al.*, 2009). Estos estudios sugieren por tanto, que la localización de estas proteínas siguiendo un patrón helicoidal



es necesaria para una replicación eficiente del fago. Basándose en estos datos, se propuso que  $\phi 29$  utiliza el citoesqueleto de actina de la bacteria como una plataforma para distribuir y organizar la replicación viral en sitios periféricos de la célula, mediada por la interacción con p16.7 (Muñoz-Espín *et al.*, 2009) (Figura 7B).



**Figura 7: Organización de la replicación de  $\phi 29$  en la membrana plasmática.**

(A) Modelo de la organización del DNA viral en la membrana plasmática mediada por la interacción de la proteína p16.7 con las bandas de ssDNA del TP-DNA. Figura tomada de Serna-Rico *et al.*, 2003. (B) Modelo de la organización de la replicación del DNA de  $\phi 29$  en la membrana plasmática mediada por la proteína p16.7 a través de la interacción de ésta con el DNA viral y con el citoesqueleto de actina bacteriano. Figura tomada de Muñoz-Espín *et al.*, 2009.

La proteína p1 es una proteína que se asocia a la membrana de *B. subtilis* (Bravo *et al.*, 1997) y localiza en el septo y en los futuros sitios de división celular durante el ciclo infectivo (Ballesteros-Plaza *et al.*, 2013). El efecto de la proteína p1 en la replicación del DNA viral *in vivo* es dependiente de la temperatura, siendo su presencia crítica a 37 °C pero dispensable a 30 °C (Bravo and Salas, 1998). La proteína p1 interacciona con la proteína bacteriana FtsZ, encargada del ensamblaje del divisoma y posterior formación del septo bacteriano. La síntesis de p1 provoca un aumento de la longitud celular, por lo que se ha propuesto que esta proteína retrasaría la formación del septo mediante la unión a FtsZ, permitiendo una elongación celular durante más tiempo. Además, se ha determinado que la producción de DNA viral es mayor en células con una longitud aumentada (Ballesteros-Plaza *et al.*, 2013).

La proteína p56 es un inhibidor de la UDG de *B. subtilis* (Serrano-Heras *et al.*, 2008; Pérez-Lago *et al.*, 2011). Aunque el genoma de  $\phi 29$  no contiene uracilos de forma natural, se ha propuesto que la codificación de un inhibidor de la UDG bacteriana podría ser ventajosa para este fago, debido a que su mecanismo de replicación implica la generación de sustratos de ssDNA. De esta manera, si durante la replicación del DNA viral se incorporasen uracilos y éstos estuviesen presentes en los intermediarios de ssDNA, componentes de la vía de reparación por excisión de bases (BER: *base excision repair*, por sus siglas en inglés) como la UDG y la AP endonucleasa serían reclutados a estos sitios y sus acciones

consecutivas generarían roturas en el esqueleto fosfato del DNA, con la consiguiente pérdida de estas regiones terminales. De acuerdo con esto, se ha determinado que la infectividad de genomas del fago que contienen uracilos es más eficiente tras su replicación en células que producen la proteína p56 que en células que no la producen (Serrano-Heras *et al.*, 2008).

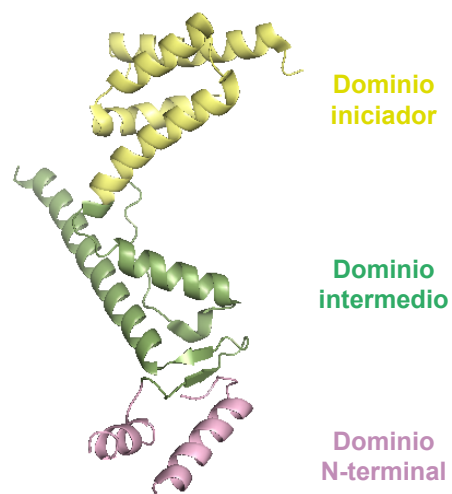
El papel de la proteína p17 en la replicación no se conoce exactamente, pero es necesaria para una replicación eficiente del DNA viral *in vivo* (Carrascosa *et al.*, 1976; González-Huici *et al.*, 2004c). Se ha demostrado que la proteína p17 favorece la unión de la p6 al DNA viral *in vivo* (González-Huici *et al.*, 2004c), probablemente induciendo un cambio topológico en éste. Además, se sabe que la proteína p17 interacciona *in vitro* con las proteínas p6 (Crucitti *et al.*, 2003), p1 y p16.7 (Ballesteros-Plaza, 2014). Finalmente, se ha determinado que la proteína p17 presenta un patrón de localización helicoidal similar al de la p16.7, y que esta localización es independiente de otros componentes virales, así como de las proteínas MreB, Mbl y MreBH (Ballesteros-Plaza, 2014).

### 2.4. La TP del bacteriófago $\phi 29$

Como se ha mencionado anteriormente, la TP es la proteína que actúa como cebador de la replicación del genoma de  $\phi 29$ , suministrando el extremo 3'OH libre necesario para la iniciación de la síntesis de DNA por la DNA polimerasa. La resolución de la estructura cristalográfica del heterodímero formado por la DNA polimerasa y la TP (Kamtekar *et al.*, 2006) permitió determinar que la TP (266 aminoácidos) tiene una estructura alargada en tres dominios (**Figura 8**):

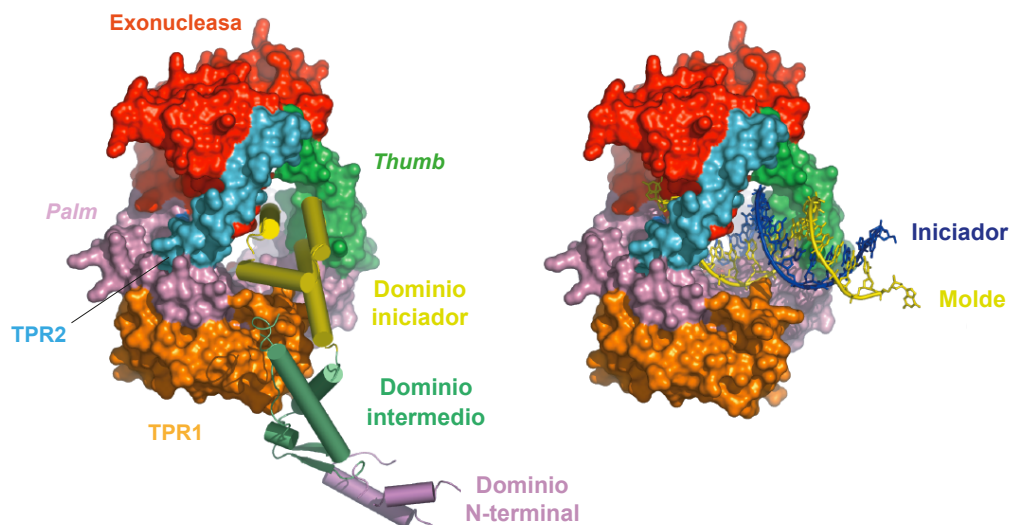
- El dominio N-terminal (residuos 1-73), cuya estructura no pudo ser resuelta ya que se encontraba desordenado en el cristal. Este dominio tiene capacidad de unión a DNA de manera inespecífica de secuencia (Zaballos and Salas, 1989).

**Figura 8: Estructura tridimensional de la TP de  $\phi 29$ .** El dominio iniciador se presenta en amarillo, el dominio intermedio en verde y el dominio N-terminal en rosa. El dominio N-terminal se presenta modelado como dos  $\alpha$ -hélices. Los datos cristalográficos corresponden al PDB ID 2EX3. La figura se realizó utilizando el *software* Pymol (<http://www.pymol.org>).



- El dominio intermedio (residuos 74-172) está compuesto por dos  $\alpha$ -hélices largas y un pequeño giro  $\beta$ . Este dominio contacta principalmente con el dominio TPR1 de la DNA polimerasa y está implicado en la especificidad de la interacción con ésta (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2007). El dominio intermedio está conectado al dominio C-terminal a través de un *loop* flexible que actúa como bisagra y que se ha propuesto que permitiría la rotación del dominio iniciador a medida que la DNA polimerasa va incorporando los primeros nucleótidos a la cadena naciente, ya que ésta iría desplazando progresivamente a la TP del centro activo de polimerización (Kamtekar *et al.*, 2006).

- El dominio C-terminal o iniciador (residuos 173-266) está formado por cuatro hélices  $\alpha$  y tiene un carácter altamente electronegativo. Este dominio también contacta ampliamente con la DNA polimerasa. En este dominio se encuentra el *priming loop* (residuos 227-233), que se encuentra desordenado en la estructura cristalográfica, y que contiene el residuo iniciador Ser232 (Hermoso *et al.*, 1985). El dominio C-terminal se ha propuesto que mimetizaría al dsDNA en sus interacciones con la DNA polimerasa, ya que ambos ocuparían el mismo lugar en el centro activo de polimerización de ésta (Kamtekar *et al.*, 2006) (**Figura 9**).



**Figura 9: El dominio iniciador de la TP se une a la DNA polimerasa de manera análoga a como lo hace una estructura de DNA molde:iniciador. (A)** Representación del heterodímero DNA polimerasa/TP. Se indican los diferentes dominios de la DNA polimerasa en esta orientación, coloreados según Kamtekar *et al.*, 2004. Se indican los distintos dominios de la TP. **(B)** Modelado de la DNA polimerasa unida a una estructura de DNA molde:iniciador a partir de la estructura terciaria de la DNA polimerasa de RB69. Adaptado de Kamtekar *et al.*, 2006.



# Objetivos

---



El conocimiento que se tiene sobre el proceso infectivo de fagos dentro de la célula infectada es muy limitado. En la presente tesis planteamos profundizar en el conocimiento de la organización temporal y espacial de la replicación del bacteriófago  $\phi 29$  *in vivo*, así como caracterizar el dominio N-terminal de la TP de este virus, mediante el abordaje de los siguientes objetivos concretos:

1. Determinar la localización subcelular de la maquinaria replicativa de  $\phi 29$ .
2. Estudiar si la localización subcelular de la maquinaria replicativa de  $\phi 29$  depende de algún componente viral o bacteriano.
3. Estudiar el papel del dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$  en la replicación del DNA viral *in vivo*.
4. Determinar la estructura secundaria del dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$ .
5. Determinar los residuos del dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$  implicados en la localización de esta proteína en el nucleoide bacteriano y en la unión a DNA.
6. Determinar el papel del dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$  en la replicación del TP-DNA viral *in vitro*.
7. Estudiar la implicación de la proteína viral p6 en las diferentes etapas de la replicación del TP-DNA viral *in vitro* utilizando mutantes de la TP de  $\phi 29$  en el dominio N-terminal.





# Materiales y Métodos

---



## 1. MATERIALES

### 1.1. Nucleótidos, oligonucleótidos y sustratos de DNA

Los nucleótidos no marcados radiactivamente fueron suministrados por Amersham Pharmacia. Los nucleótidos marcados radiactivamente [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP (3000 Ci/mmol) y [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (3000 Ci/mmol) fueron suministrados por Perkin Elmer Inc. El TP-DNA de  $\phi$ 29 se obtuvo como se había descrito en Peñalva y Salas (1982).

Los oligonucleótidos utilizados fueron suministrados por Sigma e Invitrogen, y se detallan en la **Tabla MS1 (Material Suplementario)**. En el caso de los oligonucleótidos  $\phi$ R68-T y  $\phi$ R68-D, que amplifican una región de 68 pb del extremo derecho del genoma de  $\phi$ 29, se compraron a Invitrogen y fueron purificados tras electroforesis en geles de poliacrilamida al 20%-8 M urea.

### 1.2. Proteínas

La TP mutante S232C fue purificada como se ha descrito en Garmendia *et al.*, (1990). La DNA polimerasa *wild-type* de  $\phi$ 29 y las DNA polimerasas mutantes en actividad exonucleasa D12A/D66A (Bernad *et al.*, 1989) y N62D (de Vega *et al.*, 1996) fueron purificadas como se ha descrito (Lázaro *et al.*, 1995). La proteína viral de unión a banda simple p5 (SSB) se obtuvo a partir de células de *B. subtilis* infectadas con  $\phi$ 29 y la proteína viral de unión a banda doble p6 (DBP) se obtuvo a partir de su expresión en células de *E. coli* y fueron purificadas como se ha descrito en Soengas *et al.*, (1995) y Mencía *et al.*, (2011), respectivamente.

### 1.3. Estirpes bacterianas y fagos

Las estirpes bacterianas y los fagos utilizados se muestran en las **Tablas MS2 y MS3**, respectivamente. Para los clonajes se utilizó *E. coli* XL1-Blue y DH5  $\alpha$ , y para la expresión de proteínas se utilizó *E. coli* BL21(DE3). La estirpe 168 de *B. subtilis* se considera la estirpe *wild-type*.

Puesto que la replicación de  $\phi$ 29 es inhibida por la proteína Spo0A (Castilla-Llorente *et al.*, 2006), en los ensayos de infección con  $\phi$ 29 se utilizaron estirpes bacterianas con el gen *spo0A* delecionado. En algunos casos, se utilizaron estirpes de *B. subtilis* *wild-type*, pero añadiendo al medio 2% (p/v) glucosa, que reprime la transcripción de Spo0A desde el promotor de esporulación (Yamashita *et al.*, 1989; Chibazakura *et al.*, 1991). Cuando se utilizó la estirpe de *B. subtilis* mutante  $\Delta$ *mreB*, el medio se suplementó con 25 mM MgSO<sub>4</sub> para mantener la morfología celular (Formstone and Errington, 2005).

El fago mutante  $\phi$ 29 *susI4*(1242) contiene una mutación en el gen *I4*, que codifica la holina viral, por lo que es deficiente en la lisis de la bacteria. Sin embargo, esta mutación no tiene ningún efecto en la replicación del DNA ni en la morfología del virus, lo que permite el análisis del ciclo viral a tiempos tardíos post-infección (Carrascosa *et al.*, 1976; Steiner *et al.*, 1993).

### 1.4. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las estirpes de *B. subtilis* fueron crecidas durante toda la noche en medio LB a 37 °C con el antibiótico requerido en cada caso: kanamicina (5 µg/mL), cloranfenicol (100 µg/mL), espectinomicina (100 µg/mL) o eritromicina (1 µg/mL). A la mañana siguiente el cultivo fue diluido 1:100 en medio LB nuevo conteniendo el antibiótico correspondiente, e incubado a 37 °C durante ~3 h para restablecer el crecimiento exponencial. El crecimiento de las bacterias se siguió midiendo la absorbancia del cultivo a DO<sub>600</sub> utilizando un espectrofotómetro (HITACHI). Cuando las bacterias fueron infectadas con fago, se añadió 5 mM MgSO<sub>4</sub> (concentración final) al medio.

Los ensayos de plaqueo de fago se realizaron de acuerdo a métodos estándar (Sambrook *et al.*, 1989).

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Construcción de fusiones a YFP o CFP para experimentos de microscopía de fluorescencia

Para obtener la fusión de la TP de ϕ29 a la YFP, el gen 3 se amplificó por PCR utilizando el DNA de ϕ29 como molde y el par de oligonucleótidos YFP-TP\_U y YFP-TP\_L. El producto de PCR obtenido se digirió con las enzimas de restricción XhoI y EcoRI y se clonó en el vector de integración de *B. subtilis* pSG5472, digerido con las mismas enzimas. Como resultado, el gen 3 de ϕ29 se fusionó en fase con el extremo C-terminal del gen *yfpmut2*, quedando bajo el control del promotor inducible por xilosa P<sub>xyI</sub>. El plásmido resultante se denominó pSGDM5 (**Tabla MS4**).

Para obtener la construcción pDP150-CFP, se amplificó el gen *cfp(Bs)* y una RBS de *B. subtilis* utilizando como molde el plásmido pDR200, y el par de oligonucleótidos CFP(Bs)\_U y CFP(Bs)\_L. El producto de PCR obtenido se digirió con las enzimas HindIII y NheI y se clonó en el vector pDP150 digerido con las mismas enzimas. El plásmido pDP150-CFP-2 se obtuvo utilizando el kit *QuickChange* de Stratagene y el par de oligonucleótidos 150-SpeI-1 y 150-SpeI-2 para introducir la diana de restricción de la enzima SpeI en el sitio de clonación múltiple del vector. Para obtener las construcciones pDP150-CFP/TP, pDP150-CFP/TP Nt, pDP150-CFP/TP Nt+I, pDP150/CFP-TP I, pDP150-CFP/TP I+Ct, y pDP150/CFP-TP Ct, estas regiones del gen 3 de ϕ29 se amplificaron utilizando las siguientes parejas de oligonucleótidos: TP\_U y TP\_L, TP\_U y TP-Nt\_L, TP\_U y TP-NtI\_L, TP-I\_U y TP-NtI\_L, TP-I\_U y TP\_L y TP-Ct\_U y TP\_L, respectivamente. Cada producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción SphI y SpeI y se clonaron de manera independiente en el vector pDP150-CFP-2 digerido con las mismas enzimas.

Para generar la construcción pDP150-CFP/TP-PRD1, el gen *VIII* del fago PRD1 (que codifica la TP del fago) se amplificó por PCR utilizando el par de oligonucleótidos TP8\_R y TP8\_L. El producto

de PCR resultante se digirió con las enzimas de restricción SphI y SpeI y se clonó en el vector pDP150-CFP-2 digerido con las mismas enzimas.

Para obtener los diferentes mutantes puntuales de la TP en el dominio N-terminal fusionados a YFP, se utilizó el vector pSGDM5 como molde para la mutagénesis dirigida, utilizando el kit *QuickChange* de Stratagene y las parejas de oligonucleótidos listados en la **Tabla MS1** (desde TP-R3A-R a TP-R70A-L).

Para obtener las construcciones pSGIH-TP  $\Delta$ N10 (residuos 11 a 266), pSGIH-TP  $\Delta$ N15 (residuos 16 a 266), pSGIH-TP  $\Delta$ N20 (residuos 21 a 266), pSGIH-TP  $\Delta$ Nt (residuos 74 a 266), pSGIH-TP Nt16-70 y pSGIH-TP Nt16-73, se amplificó mediante PCR la secuencia del gen 3 de  $\phi$ 29 comprendida entre los residuos indicados en cada caso, utilizando el DNA de  $\phi$ 29 como molde y las parejas de oligonucleótidos TP- $\Delta$ N10 XhoI-R y TP EcoRI-L, TP- $\Delta$ N15 XhoI-R y TP EcoRI-L, TP- $\Delta$ N20-XhoI-R y TP EcoRI-L, TP- $\Delta$ Nt-XhoI-R y TP EcoRI-L, TP- $\Delta$ N15-XhoI-R y Nt16-70-EcoRI-L, y TP- $\Delta$ N15-XhoI-R y Nt16-73-EcoRI-L, respectivamente, que contenían en 5' las dianas de restricción para las enzimas EcoRI y XhoI. Estos fragmentos se digirieron con EcoRI y XhoI y se clonaron en el vector pSG5472 previamente digerido con las mismas enzimas.

En el caso de las construcciones pSGIH-TP Nt1-24, pSGIH-TP Nt1-37, pSGIH-TP Nt1-50, pSGIH-TP Nt1-60, pSGIH-TP Nt1-70, pSGIH-TP Nt1-73 y pSGIH-TP Nt+I se obtuvieron utilizando como molde el plásmido pSGDM5 y las parejas de oligonucleótidos Nt1-24-R y Nt1-24-L, Nt1-37-R y Nt1-37-L, Nt1-50-R y Nt1-50-L, Nt1-60-R y Nt1-60-L, Nt1-70-R y Nt1-70-L, Nt1-73-R y Nt1-73-L, y NtI-R y NtI-L, respectivamente, para introducir dos codones de parada después del último residuo indicado en cada caso, utilizando el kit *QuickChange* de Stratagene.

Las construcciones resultantes se transformaron en células de *E. coli* XL1-Blue competentes y se seleccionaron los transformantes resistentes a ampicilina. Para aislar el DNA plasmídico se utilizó el kit de purificación *Wizard Plus SV Miniprep* de Promega. Una vez purificados los plásmidos y secuenciados para detectar la presencia de las construcciones deseadas, se transformaron células de *B. subtilis* 168 competentes.

Para purificar los productos de las reacciones de PCR se utilizó el kit *QiaQuick Gel Extraction* de Qiagen.

## **2.2. Clonaje del gen 3 de $\phi$ 29 en el vector pDP150 para ensayos de complementación de la infección con el fago *sus3*(91)**

Para obtener la construcción pDP150-TP, el gen 3 se amplificó por PCR utilizando el DNA de  $\phi$ 29 como molde y el par de oligonucleótidos TP\_1 y TP\_2. El producto de PCR obtenido se digirió con las enzimas de restricción NheI y SphI y se clonó en el vector de integración pDP150 digerido con las mismas enzimas.

### 2.3. Transformación de *B. subtilis*

Para transformar las estirpes de *B. subtilis*, éstas se crecieron en medio de competencia [medio SMM (1,4% (p/v)  $K_2HPO_4$ , 0,6% (p/v)  $KH_2PO_4$ , 0,2% (p/v)  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,1% (p/v) citrato trisódico dihidratado y 0,02% (p/v)  $MgSO_4$ ) suplementado con 0,2% (p/v) casaminoácidos, 0,5% (p/v) glucosa, 6 mM  $MgSO_4$ , 0,02% (p/v) triptófano y trazas de citrato de amonio férrico] durante 3 horas a 37 °C. A continuación se añadió el mismo volumen de medio de inanición (medio SMM suplementado con 0,5% (p/v) glucosa y 6 mM  $MgSO_4$ ) precalentado y las células se crecieron durante 2 horas adicionales a 37 °C. En este punto se tomaron alícuotas de 0,4 mL de cultivo y se añadió ~3 µg del plásmido deseado. Estas muestras fueron incubadas a 37 °C durante 1 hora y extendidas en medio sólido (LB-1,5% agar) con el antibiótico correspondiente. Para confirmar que la inserción del plásmido en los transformantes resistentes a espectinomicina había tenido lugar por un entrecruzamiento doble en el *locus amyE* del cromosoma, se seleccionaron los transformantes que perdieron la actividad amilasa. En el caso de los transformantes resistentes a eritromicina, se confirmó que la inserción en el *locus thrC* del cromosoma había tenido lugar por un entrecruzamiento doble seleccionando los transformantes que perdieron la resistencia a espectinomicina. Para obtener las estirpes delecionadas en el gen *spo0A*, se transformó la estirpe deseada con DNA cromosómico procedente de la estirpe de *B. subtilis* SWV215 y se seleccionaron los transformantes resistentes a kanamicina en placas de LB-1,5% agar conteniendo 5 µg/mL de dicho antibiótico.

### 2.4. Microscopía de fluorescencia

Para analizar la localización subcelular de las proteínas fusionadas a YFP o a CFP, las células que expresan estas fusiones fueron crecidas en medio LB con el antibiótico apropiado e incubadas a 37 °C. La expresión de las proteínas de fusión fue inducida a  $DO_{600} \sim 0,3-0,4$  mediante la adición al medio de 0,5% (p/v) xilosa o 1 mM IPTG (concentración final). Treinta minutos después de la inducción se añadió DAPI (1 µg/mL) al medio y las células fueron inmovilizadas en un portaobjetos cubierto con una fina capa de agarosa al 1% (p/v) en agua, esencialmente como se había descrito previamente (Glaser *et al.*, 1997). La adquisición de las imágenes se llevó a cabo utilizando una cámara CCD C9100-02 (Hamamatsu) acoplada a un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200 M. Las imágenes fueron adquiridas con el programa METAMORPH versión 7.1.2. Para visualizar las células se utilizó el objetivo 100x 1.45 Plan-Fluar (Zeiss) y los filtros para DAPI (359-371, 450LP), YFP (490-510, 510-560, HQ520LP) y CFP (426-446/422-432, 455 DCLP, 460-500) o el filtro dicróico CFP/YFP (440-500, 510-610). Las imágenes fueron procesadas utilizando el paquete de procesamiento de imágenes Fiji (Rasband, 1997-2011).

## 2.5. Microscopía de inmunofluorescencia

La estirpe de *B. subtilis* 110NA se creció a 37 °C en medio LB suplementado con 5 mM MgSO<sub>4</sub>. A una DO<sub>600</sub> de ~0,45 el cultivo se infectó con fago *sus3*(91) a una MOI de 25 y se tomaron muestras de cultivo a los 15 min post-infección para ser procesadas. Las muestras se fijaron con 1,4% (v/v) formaldehído, 0,0025% (v/v) glutaraldehído y 23 mM PBS durante 15 min a temperatura ambiente y 30 min en hielo. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en tampón GTE (50 mM glucosa, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA). A continuación, las células se permeabilizaron con 2 mg/mL (p/v) de lisozima durante 30 s y se pusieron en un portaobjetos multipocillo (Thermo Scientific) que había sido tratado previamente con 0,01% (v/v) poli-L-lisina (Sigma). Para detectar la TP parental de  $\phi$ 29, se utilizaron anticuerpos policlonales de rata (dilución 1:1000) durante 1 h a temperatura ambiente. Se utilizaron anticuerpos secundarios anti-rata conjugados al fluoróforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) (dilución 1:1000) y se incubaron a 4 °C durante la noche. Los anticuerpos fueron centrifugados a 14000 g durante 10 min a 4 °C antes de utilizarlos para precipitar posibles agregados. Para detectar el DNA celular se añadió DAPI (2 µg/mL) al medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories).

La adquisición de las imágenes se llevó a cabo utilizando una cámara CCD C9100-02 (Hamamatsu) acoplada a un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200 M. Las imágenes fueron adquiridas con el programa METAMORPH versión 6. Para visualizar las células se utilizó el objetivo 100x 1.45 Plan-Fluar (Zeiss) y el filtro para FITC. Las imágenes fueron procesadas utilizando el paquete de procesamiento de imágenes Fiji (Rasband, 1997-2011).

## 2.6. Análisis de la síntesis de DNA viral a lo largo de la infección mediante electroforesis en geles de agarosa y qPCR

Las estirpes de *B. subtilis* indicadas en cada caso fueron crecidas a 37 °C en medio LB suplementado con 5 mM MgSO<sub>4</sub> e infectadas con el fago *sus3*(91) a la MOI indicada en cada caso. A los tiempos indicados post-infección se tomó 1 mL de cultivo, se centrifugó, y el *pellet* de células se resuspendió en 500 µL de tampón BBA (10 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl y 20% (p/v) sacarosa) con 4 mg/mL de lisozima y se incubó durante 10 min a -70 °C y 15 min a 37 °C. A continuación se añadió proteinasa K (50 µg/mL) y 10% (p/v) sarcosil (concentración final), y las muestras se incubaron 20 min a 60 °C. Finalmente, el DNA se purificó mediante una extracción fenol/cloroformo. La cantidad de DNA acumulado a lo largo del ciclo infectivo se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0,6% (p/v) (Bravo *et al.*, 1994) y posterior tinción con bromuro de etidio (1 µg/mL). Para cuantificar la acumulación de DNA viral por qPCR, se tomó una dilución 1/50 de la muestra de DNA total y se utilizó el par de oligonucleótidos R-25 y R-OUT-SUPER, que amplifican una región de 298 pb del extremo derecho del genoma de  $\phi$ 29. La qPCR se llevó a cabo utilizando un termociclador

Light Cycler y el kit *Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I* de Roche. Los datos obtenidos de las reacciones de amplificación fueron interpolados a una recta patrón construida con cantidades conocidas de DNA de  $\phi 29$ . Los datos fueron expresados en  $\mu\text{g}$  de DNA viral por mL de cultivo.

### 2.7. Clonaje, expresión y purificación de la TP *wild-type* de $\phi 29$ y los mutantes de la TP en el dominio N-terminal

El gen 3 de  $\phi 29$  fue clonado en el vector de expresión pET52b(+) (Novagen) para expresar la TP fusionada al *Strep-tag* y poder ser purificada posteriormente utilizando columnas Strep-Tactin (Schmidt and Skerra, 2007). Para ello, el gen 3 de  $\phi 29$  fue amplificado mediante PCR utilizando el DNA de  $\phi 29$  como molde y los oligonucleótidos TP-XmaI-R (que contiene en 5' la diana de restricción XmaI) y TP EagI-L (que contiene en 5' la diana de restricción EagI). El producto resultante de la amplificación se purificó utilizando el kit *QiaQuick Gel Extraction* de Qiagen y fue digerido utilizando las enzimas de restricción XmaI y EagI y ligado con el vector pET52b(+), previamente digerido con las mismas enzimas. Para la obtención de las TPs  $\Delta\text{N15}$  y  $\Delta\text{N20}$ , y de las variantes de la TP delecionada conteniendo el fragmento N-terminal, el N-terminal + Intermedio y el Intermedio + C-terminal se siguió el mismo método, utilizando las parejas de oligonucleótidos TP- $\Delta\text{N15}$  XmaI-R y TP EagI-L, TP- $\Delta\text{N20}$  XmaI-R y TP EagI-L, TP XmaI-R y Nt EagI-L, TP XmaI-R y Ntl EagI-L, y ICt XmaI-R y TP EagI-L, respectivamente.

Para obtener los diferentes mutantes puntuales de la TP (TPR19A, TPK25A, TPK27A, TPK25A/K27A y TPK32A/TPK33A/TPK34A), el plásmido pET52b(+)-TP se utilizó como molde para realizar la mutagénesis dirigida sobre el gen 3 utilizando el kit *QuickChange* de Stratagene y las parejas de oligonucleótidos TP-R19A-R y TP-R19A-L, TP-K25A-R y TP-K25A-L, TP-K27A-R y TP-K27A-L, TP-K25A/K27A-R y TP-K25A/K27A-L, y TP-K32A/K33A/K34A-R y TP-K32A/K33A/K34A-L, respectivamente.

Para la expresión de estas proteínas se transformó la estirpe de *E. coli* BL21(DE3), que contiene el gen de la RNA polimerasa de T7 bajo el promotor *lacUV5* inducible por IPTG (Studier y Moffatt, 1986), con las construcciones mencionadas anteriormente.

Las células fueron crecidas durante la noche a 34 °C en medio de autoinducción (Studier, 2005) con 100  $\mu\text{g/mL}$  de ampicilina, se recogieron por centrifugación (15 min a 8000 rpm y 4 °C) y se lisaron mediante abrasión con alúmina durante 20 min a 4 °C. El lisado se resuspendió en 3,5 volúmenes (del peso del precipitado celular) de tampón 6 (50 mM Tris-HCl, pH 8, 5% (v/v) glicerol, 1 mM EDTA, 7 mM 2-mercaptoetanol) con 0,05% (v/v) Tween 20, inhibidores de proteasa “cOmplete Protease Inhibitor Cocktail” (Roche) y 1 M NaCl, y se centrifugó a 3000 x g durante 3 min para eliminar la alúmina. El precipitado se resuspendió en 1,5 volúmenes de tampón 6 con 0,05% (v/v) Tween 20, inhibidores de proteasa “cOmplete Protease Inhibitor Cocktail” de Roche y 1 M NaCl, y se volvió a centrifugar a 3000



x g durante 3 min. Se juntaron los sobrenadantes resultantes de las dos centrifugaciones anteriores y se realizó una centrifugación a 15000 x g durante 30 min para eliminar los restos celulares. En estas condiciones todas las TPs (excepto Nt y Nt+I) fueron recuperadas de la fracción insoluble. Las proteínas fueron solubilizadas con tampón D (50 mM Tris-HCl, pH 8, 25% (v/v) glicerol, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, 10 mM DTT) en presencia de 6 M hidrocloreuro de guanidina y centrifugadas a 15000 x g durante 15 min. Las muestras se dializaron contra el tampón 6D (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 25% (v/v) glicerol, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 0,05% (v/v) Tween 20) y el dializado se centrifugó a 15000 x g durante 15 min. El sobrenadante se cargó en columnas de Strep-Tactin y las proteínas fueron purificadas como se había descrito (Schmidt and Skerra, 2007). Finalmente, las proteínas se eluyeron en tampón de elución (Schmidt and Skerra, 2007) y se dializaron contra 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50% (v/v) glicerol, 1 mM EDTA, 7 mM 2-mercaptoetanol y 0,3 M NaCl.

### **2.8. Digestión del *Strep-tag* con trombina HRV C3**

La TP *wild-type* y la TP mutante  $\Delta$ Nt se digirieron con trombina utilizando el kit *HRV 3C protease* (Novagen), para eliminar el *strep-tag*. La digestión se llevó a cabo utilizando 0,2 unidades de proteasa por  $\mu$ g de proteína durante 17 h a 4 °C. Para eliminar la trombina fusionada a un *tag* de histidinas, las muestras se pasaron por una columna de  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agarosa, tras lo cual se concentraron por centrifugación utilizando un microcon YM-30 (Millipore), quedando las proteínas en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50% (v/v) glicerol, 1 mM EDTA, 7 mM 2-mercaptoetanol y 0,3 M NaCl. La digestión completa de las proteínas se confirmó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS.

La TP *wild-type* sin *Strep-tag* y la TP mutante  $\Delta$ Nt sin *Strep-tag* se utilizaron en ensayos de retraso en gel, interferencia, replicación y amplificación del TP-DNA de  $\phi$ 29, comportándose de manera similar a las mismas proteínas con el *Strep-tag* fusionado (no mostrado).

### **2.9. Ensayo de retraso en gel**

El fragmento de 216 pb correspondiente al gen *yshC* de *B. subtilis* fue amplificado por PCR utilizando el par de oligonucleótidos yshC-R y yshC-L. El producto de PCR fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y posteriormente purificado utilizando el kit *Qiaquick Gel Extraction* (Qiagen). Este sustrato de DNA fue marcado radiactivamente en los extremos 5' utilizando  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  y la enzima polinucleótido quinasa de T4 (New England Biolabs). Para eliminar el nucleótido no incorporado, el marcaje se pasó por columnas *mini Quick Spin DNA columns* (Roche). En el caso del fragmento de dsDNA de 68 pb correspondiente al extremo derecho del genoma de  $\phi$ 29, los oligonucleótidos  $\phi$ R68-T y  $\phi$ R68-D se hibridaron en presencia de 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, y 0,2 M NaCl y fueron posteriormente marcados en los extremos 5' utilizando  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  y la enzima

polinucleótido quinasa de T4 (New England Biolabs). Para eliminar el nucleótido no incorporado, el marcaje se pasó por columnas *mini Quick Spin DNA columns* (Roche). En el caso del sustrato de ssDNA de 68-mer, el oligonucleótido  $\phi$ R68-T se marcó en 5' como se ha descrito anteriormente y el marcaje se pasó por columnas *mini Quick Spin Oligo columns* (Roche). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20  $\mu$ L que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0,1 mg/mL BSA, 1 nM del sustrato de DNA marcado en 5' y la concentración indicada de la proteína utilizada en cada caso. Tras una incubación de 5 min a 4 °C, las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% (p/v) que contenían 12 mM Tris-acetato, pH 7,5, y 1 mM EDTA y corridos en el mismo tampón a 25 mA y 4 °C durante 1,5 h. Tras la electroforesis, los geles se secaron y se autorradiografiaron. Los complejos TP/DNA se detectaron en las autorradiografías como un retraso en la movilidad del sustrato marcado. La cuantificación del sustrato retrasado se llevó a cabo densitometrando la(s) banda(s) retrasada(s) en presencia de la TP correspondiente y comparándola con la banda de sustrato en ausencia de proteína. Los valores obtenidos para las TPs mutantes se relativizaron al valor obtenido con la TP *wild-type* (100%).

### 2.10. Ensayo de entrecruzamiento proteína-DNA con formaldehído e inmunoprecipitación *in vivo*.

Este ensayo se llevó a cabo esencialmente como había sido descrito (González-Huici *et al.*, 2004). Las estirpes de *B. subtilis* que expresan las distintas TPs fusionadas a YFP se crecieron a 30 °C hasta una  $DO_{600}$  de ~0,45, a la cual se indujo la expresión de las proteínas de fusión mediante la adición de 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final) al medio. Una hora después de la inducción, se tomó 1 mL de cultivo para analizar la acumulación de las proteínas de fusión por *Western Blot* y el resto (20 mL) se trató con 1% (v/v) formaldehído (concentración final) durante 5 min. La reacción de entrecruzamiento se paró con 125 mM glicina (concentración final). A continuación, las células fueron lisadas y el DNA fragmentado mediante sonicación en fragmentos de un tamaño aproximado de 750 pb. Tras la sonicación, se tomó 1/20 de cada muestra para el posterior análisis del DNA total. El resto de la muestra se dividió en 2 fracciones, una fue utilizada para la inmunoprecipitación con anticuerpos específicos contra la TP y la otra como control de la precipitación inespecífica con el suero pre-inmune, durante 16 horas a 4 °C en un agitador rotacional. A continuación se añadieron 60  $\mu$ L de una suspensión de proteína A-agarosa al 25% y se incubaron las muestras durante 3 h a 4 °C en un agitador rotacional. La resina se centrifugó y lavó varias veces antes de resuspenderla en TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA)-1% SDS para proceder a la reversión de los entrecruzamientos mediante incubación a 65 °C durante la noche. La muestra que se había tomado para el análisis del DNA total se procesó de la misma manera, añadiendo TE-1% SDS e incubando en las condiciones anteriormente descritas. A continuación se centrifugaron las muestras para sedimentar la resina y se rescató el sobrenadante, que se transfirió a

un tubo nuevo. Las muestras se llevaron hasta un volumen de 300 µL de TE y se trataron con RNasa A (50 µg/mL) durante 15 min a 37 °C y proteinasa K (50 µg/mL) durante 3 horas a 37 °C. Finalmente, las muestras fueron sometidas a una extracción fenol/cloroformo y posterior precipitación con etanol.

La qPCR se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad CFX 384 en un volumen de reacción de 10 µL con 4 µL de una dilución 1/40 de cada muestra, 1 µL de cada par de oligonucleótidos (ftsZ-R y ftsZ-L, gyrB-R y gyrB-L, mreB-R y mreB-L, y ung-R y ung-L) a 2,5 µM y 5 µL de mezcla de reacción *Power Sybr Green* (Applied Biosystems). Los parámetros utilizados fueron: 10 min a 95 °C seguidos de 40 ciclos de 2 etapas a 95 °C durante 15 s y 64 °C durante 60 s, y un análisis final de disociación de los productos a 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 15 s y 95 °C durante 15 s, para comprobar la presencia de un único producto amplificado.

La unión de la TP fue expresada como Coeficiente de Inmunoprecipitación (CI);  $CI = [(\alpha TP - \pi)/T]$ , donde “αTP” representa el DNA inmunoprecipitado utilizando el anticuerpo específico contra la TP, “pi” representa el DNA inmunoprecipitado con el suero pre-inmune y “T” representa el DNA total. En el caso de la cuantificación absoluta de las copias de cada región del genoma de *B. subtilis* inmunoprecipitadas, se utilizó un termociclador ABI PRISM 7900HT SDS (Applied Biosystems) y los datos se interpolaron a una curva patrón generada mediante cantidades conocidas del genoma de *B. subtilis*.

## **2.11. Ensayo de interacción entre proteínas utilizando el sistema de doble híbrido en levadura**

Los genes de *B. subtilis* *hbs*, *noc*, *smc*, *scpA* y *scpB*, y los genes 2 y 3 de φ29, fueron amplificados por PCR utilizando el DNA genómico de la estirpe 168 de *B. subtilis* y el DNA de φ29, respectivamente. Estos genes se clonaron tanto en el vector pGBDU (Ura<sup>+</sup>) como en el vector pGAD (Leu<sup>+</sup>), quedando fusionados en fase con el extremo C-terminal del dominio de unión a DNA de GAL4 (BD) y el dominio de activación de GAL4 (AD), respectivamente. La estirpe haploide de *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4a se transformó con las diferentes variantes del vector pGBDU conteniendo los genes indicados anteriormente, las colonias Ura<sup>+</sup> se seleccionaron y se conjugaron con la estirpe haploide PJ69-4α (que había sido transformada con las diferentes variantes del vector pGAD). Los diploides (Ura<sup>+</sup> Leu<sup>+</sup>) se seleccionaron en medio sintético completo sólido que carecía de uracilo y leucina (- LU). En estas células se analizó la expresión de los fenotipos de interacción (His<sup>+</sup> y Ade<sup>+</sup>) haciendo una réplica en placas de medio sintético completo sólido que carecía de histidina (- LUH) o adenina (- LUA), como se ha descrito previamente (Carballido-López *et al.*, 2006a), e incubándolas 7 días a 30 °C. Este ensayo fue realizado por la Dra. Rut Carballido López.

### 2.12. Análisis de la acumulación de proteína por *Western Blot*

Las estirpes de *B. subtilis* indicadas en cada caso fueron crecidas a 37 °C (30 °C en el caso de los experimentos de X-ChiP), y la expresión de las proteínas fue inducida durante la fase exponencial de crecimiento con el inductor indicado en cada caso o infectadas con el fago indicado. Se tomaron alícuotas de 1 mL de cultivo a los tiempos indicados post-inducción o post-infección, se centrifugaron y se descartó el sobrenadante. El *pellet* de células se resuspendió en 250 µl de tampón de carga (37 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% (p/v) SDS, 4% (v/v) 2-mercaptoetanol, y 13% (v/v) glicerol) y se sometió a sonicación. A continuación las muestras fueron calentadas a 95 °C durante 5 min y sometidas a electroforesis en geles de tris-tricina al 16% de poliacrilamida-0,1% SDS. Tras la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana Immobilon-P de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore) como se había descrito previamente (Meijer *et al.*, 2001b). Posteriormente, las membranas fueron incubadas con anticuerpos de conejo anti-TP (dilución 1:3000) o anticuerpos de ratón anti-GFP (dilución 1:500) durante la noche a 4 °C. Posteriormente, para la detección de los complejos antígeno-anticuerpo, las membranas se incubaron con anticuerpos anti-conejo o anti-ratón (diluciones 1:4000) conjugados con peroxidasa de rábano durante 1 h a temperatura ambiente. La detección de los complejos inmunes se llevó a cabo utilizando el kit ECL (*Enhanced Chemiluminescence*) de Amersham. Como control, se cargaron las cantidades de TP purificada indicadas en cada caso.

### 2.13. Espectroscopía de dicroísmo circular

Para la determinación de la estructura secundaria del dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$  mediante espectroscopía de dicroísmo circular, éste se preparó a una concentración de 20 µM en 25 mM tampón fosfato sódico, pH 7,5, 0,2 M NaCl. Las mediciones se llevaron a cabo utilizando un espectropolarímetro Jasco-600 equipado con una unidad de control de la temperatura NESLAB RTE-100 acoplada a un ordenador. El espectro de DC representa la media de 4 escaneos entre 190 y 250 nm de longitud de onda, utilizando cubetas de 0,1 cm de paso óptico y realizados a 25 °C a una velocidad de 50 nm/min, un tiempo de respuesta de 2 s y un ancho de banda de 1 nm. Los datos fueron analizados utilizando el programa CCA (*Convex Constraint Analysis*) (Perczel *et al.*, 1991).

### 2.14. Ensayo de cosedimentación por ultracentrifugación en gradiente de glicerol

Para analizar la interacción de la DNA polimerasa con la TP *wild-type* o las diferentes TPs mutantes, la mezcla de reacción contenía, en 200 µL, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 mg/mL BSA, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 448 nM de TP *wild-type* o mutante y 448 nM de DNA polimerasa. Las muestras se incubaron a 4 °C durante 30 min y a continuación fueron cargadas en la parte superior de un gradiente de glicerol del 15% al 30% (v/v). El gradiente, de 4 mL, se elaboró en un tampón que

contenía 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 20 mM sulfato amónico, 180 mM NaCl, 1 mM EDTA y 7 mM 2-mercaptoetanol, y se sometió a ultracentrifugación a 58000 rpm (en un rotor Beckman TST 60.4) durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente, se recogieron las diferentes fracciones desde la parte inferior del gradiente y se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS. Después de la separación electroforética, los geles se tiñeron con SYPRO Ruby para identificar las fracciones correspondientes al heterodímero TP/DNA polimerasa (97 KDa) y los monómeros de DNA polimerasa (66 KDa) y TP (31 KDa). Como marcador de peso molecular se cargó en cada gradiente 448 nM de BSA, la cual es un monómero en solución.

En el caso del análisis de la interacción entre la DNA polimerasa o la TP *wild-type* con la proteína p6, la mezcla de reacción contenía, en 200 µl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 mg/mL BSA, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 713 nM de p6 y 713 nM de DNA polimerasa o 713 nM de TP *wild-type*. En el caso de la incubación de las tres proteínas simultáneamente, la mezcla de reacción contenía, en 200 µl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 mg/mL BSA, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 713 nM de DNA polimerasa, 713 nM de TP *wild-type* y 713 nM de proteína p6. Los gradientes se prepararon en las condiciones descritas anteriormente, conteniendo 90 o 180 mM NaCl. Las condiciones de incubación y de centrifugación son las mismas que las detalladas en el párrafo anterior. Las diferentes fracciones se recogieron desde la parte inferior del gradiente y se analizaron mediante electroforesis en geles en gradiente de poliacrilamida del 10 al 20%-0,1% SDS. Después de la separación electroforética, los geles se tiñeron con SYPRO Ruby para identificar las fracciones correspondientes al heterodímero TP/DNA polimerasa (97 KDa) y los monómeros de DNA polimerasa (66 KDa), TP (31 KDa) y p6 (12 KDa). Como marcador de peso molecular se cargó en cada gradiente 713 nM de BSA, la cual es un monómero en solución.

### **2.15. Ensayo de iniciación de la replicación del TP-DNA de $\phi$ 29 (formación del complejo TP-dAMP)**

La mezcla de reacción utilizada contenía, en 25 µl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 mg/mL BSA, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0,2 µM dATP (1 µCi [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP), 12 nM DNA polimerasa *wild-type*, 12 nM TP *wild-type* o mutante, 1,6 nM de TP-DNA como molde y 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Las reacciones se llevaron a cabo tanto en ausencia como en presencia de 35 µM de proteína p6. Las reacciones se incubaron durante 2 minutos a 30 °C y se pararon con 10 mM EDTA-0,1% SDS concentración final. Las muestras se filtraron por centrifugación a través de columnas de Sephadex G50 en presencia de 0,1% SDS y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS. La cuantificación se llevó a cabo mediante densitometría de las bandas correspondientes al complejo TP-dAMP detectadas por autorradiografía, utilizando el programa *Quantity One*.

En todas las reacciones las cantidades indicadas de DNA polimerasa y TP fueron preincubadas durante 30 min a 4 °C.

### 2.16. Ensayo de formación del complejo TP-dAMP en ausencia de molde

La mezcla de reacción utilizada fue igual que la descrita para el ensayo de iniciación en presencia de TP-DNA, pero en ausencia de éste y utilizando 24 nM de TP *wild-type* o mutante, 24 nM de DNA polimerasa y 1 mM MnCl<sub>2</sub>. Las reacciones se incubaron durante 1 h a 30 °C y fueron procesadas como se ha descrito en el apartado anterior.

En todas las reacciones las cantidades indicadas de DNA polimerasa y TP fueron preincubadas durante 30 min a 4 °C.

### 2.17. Ensayo de interferencia

Con este ensayo se analizó la capacidad de las TPs mutantes de competir con la TP *wild-type* por la unión a la DNA polimerasa de  $\phi$ 29. El experimento se llevó a cabo en las mismas condiciones que el ensayo de formación del complejo TP-dAMP en ausencia de molde, pero dejando fija la cantidad de TP *wild-type* (24 nM) y DNA polimerasa (24 nM), y añadiendo cantidades crecientes (24, 48, 96 y 192 nM) de las diferentes TPs mutantes. Como control positivo de interferencia se utilizó la TP mutante S232C, que es catalíticamente inactiva pero que interacciona con la DNA polimerasa de manera *wild-type* (Garmendia *et al.*, 1990). En paralelo se llevaron reacciones dejando fija la cantidad de TP mutante S232C (24 nM) y DNA polimerasa (24 nM), y añadiendo cantidades crecientes (24, 48, 96 y 192 nM) de las TPs mutantes, para restar posteriormente estos valores de formación del complejo TP-dAMP a los valores obtenidos compitiendo a la TP *wild-type* con la TP mutante correspondiente. En todos los casos la última proteína que se añade a la reacción es la DNA polimerasa. La incubación de las muestras se llevó a cabo durante 1 h a 30 °C. La cuantificación se llevó a cabo mediante densitometría de las bandas correspondientes al complejo TP-dAMP detectadas por autorradiografía, utilizando el programa *Quantity One*.

Para analizar la competición de la TP mutante  $\Delta$ Nt con la TP *wild-type* por la unión a la DNA polimerasa tanto en ausencia como en presencia (35  $\mu$ M) de la proteína p6, el ensayo se realizó en las mismas condiciones descritas para los ensayos de formación del complejo TP-dAMP en presencia de TP-DNA, pero dejando fija la cantidad de TP *wild-type* (12 nM) y DNA polimerasa (12 nM), y añadiendo cantidades crecientes (12, 24, 48 y 96 nM) de la TP mutante  $\Delta$ Nt. Como control, la TP *wild-type* fue competida con cantidades crecientes (12, 24 48 y 96 nM) de la TP mutante S232C, tanto en ausencia como en presencia (35  $\mu$ M) de la proteína p6. En todos los casos la última proteína que se añade a la reacción es la DNA polimerasa. La incubación de las muestras se llevó a cabo durante 2 min a 30 °C.



### 2.18. Medida de la afinidad por nucleótido de la DNA polimerasa de $\phi 29$

El cálculo de la constante de Michaelis ( $K_m$ ) de la DNA polimerasa por el nucleótido iniciador en la reacción de iniciación se llevó a cabo utilizando 480 nM de TP *wild-type* o mutante y 12 nM de DNA polimerasa, 10 mM  $MgCl_2$ , 1,6 nM de TP-DNA como molde y cantidades crecientes de dATP (desde 0,5  $\mu M$  a 2 mM en ausencia de p6 y desde 0,125 a 100  $\mu M$  en presencia de 35  $\mu M$  p6). Ensayos de interferencia en estas condiciones de exceso de 40 veces de TP sobre DNA polimerasa (480 nM de TP *wild-type* o mutante y 12 nM de DNA polimerasa) muestran que la interacción entre la DNA polimerasa y la TP *wild-type* o las TPs mutantes es similar (no mostrado). Las reacciones se incubaron durante 4 minutos a 30 °C y se pararon y analizaron como se ha descrito anteriormente. La formación del complejo TP-dAMP fue representada frente a la concentración de dATP. Los valores para la  $K_m$  de la DNA polimerasa por dATP se obtuvieron ajustando los datos a una hipérbola rectangular mediante regresión no lineal por mínimos cuadrados utilizando el programa Kaleidagraph 3.6.4.

### 2.19. Ensayo de transición

La mezcla de reacción utilizada contenía, en 25  $\mu l$ , 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 mg/mL BSA, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 5  $\mu M$  dATP (1  $\mu Ci$  [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]dATP), dGTP y dTTP, 12 nM de la DNA polimerasa mutante N62D (de Vega *et al.*, 1996) que está muy afectada en su actividad de exonucleolisis 3'-5' pero que tiene capacidad de desplazamiento de banda, 12 nM de TP *wild-type* o mutante y 1,6 nM de TP-DNA como molde. Las reacciones se llevaron a cabo tanto en ausencia como en presencia de 35  $\mu M$  p6. La reacción se paró con 10 mM EDTA-0,1% SDS concentración final. Las muestras se filtraron por centrifugación en columnas de Sephadex G50 en presencia de 0,1% SDS. Para permitir la separación de los diferentes productos originados, las muestras se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS de alta resolución (360  $\times$  280  $\times$  0,5 mm).

En todas las reacciones las cantidades indicadas de DNA polimerasa y TP fueron preincubadas durante 30 min a 4 °C.

### 2.20. Ensayo de replicación del TP-DNA de $\phi 29$

La mezcla de reacción utilizada contenía, en 25  $\mu l$ , 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 mg/mL BSA, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 20  $\mu M$  de cada dNTP (1  $\mu Ci$  [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]dATP), 12 nM de DNA polimerasa, 12 nM de TP *wild-type* o mutante, 1,6 nM de TP-DNA como molde y 10 mM  $MgCl_2$ . Las reacciones se llevaron a cabo tanto en ausencia como en presencia de 35  $\mu M$  p6 y se incubaron durante 5 y 10 min a 30 °C. La reacción se paró con 10 mM EDTA-0,1% SDS concentración final. Las muestras se filtraron por centrifugación en columnas de Sephadex G50 en presencia de 0,1% SDS. La actividad relativa se calculó a partir de la radiación Cerenkov correspondiente al volumen excluido. El análisis de los tamaños del DNA sintetizado se llevó a cabo mediante su desnaturalización

con 0,7 M NaOH y posterior electroforesis en gel de agarosa alcalino al 0,7% (McDonnel *et al.*, 1977). Después de la electroforesis, el gel fue secado y autorradiografiado.

En todas las reacciones las cantidades indicadas de DNA polimerasa y TP fueron preincubadas durante 30 min a 4 °C.

### 2.21. Ensayo de amplificación del TP-DNA de $\phi 29$

La mezcla de reacción utilizada contenía, en 25  $\mu$ l, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 mg/mL BSA, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 80  $\mu$ M de cada dNTP (1  $\mu$ Ci [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP), 30  $\mu$ M de p5, 35  $\mu$ M de p6, 6 nM de DNA polimerasa, 6 nM de TP *wild-type* o mutante, 1,6 pM de TP-DNA como molde y 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Las muestras se incubaron durante los tiempos indicados a 30 °C y fueron procesadas como se ha descrito en el ensayo de replicación del TP-DNA de  $\phi 29$ .

Para determinar la funcionalidad como TP parental de la TP mutante  $\Delta$ Nt, la mezcla de reacción utilizada fue la misma que en el párrafo anterior pero se utilizó un volumen de reacción inicial de 600  $\mu$ l. La reacción se incubó a 30 °C y se fueron tomando alícuotas de 25  $\mu$ l a los tiempos indicados, que se pararon con 10 mM EDTA-0,1% SDS (concentración final). Tras 90 minutos de incubación, la reacción fue dividida en tres; a una de ellas se añadió heterodímero *wild-type* (TP *wild-type*/DNA polimerasa) adicional, a otra se añadió heterodímero mutante (TP  $\Delta$ Nt /DNA polimerasa) y a la otra se añadió el mismo volumen del tampón de dilución de las proteínas (25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,05% Tween20). Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 150 minutos más y se fueron tomando alícuotas de 25  $\mu$ l a los tiempos indicados, que se pararon con 10 mM EDTA-0,1% SDS (concentración final). Las muestras fueron procesadas como se ha descrito en el ensayo de replicación del TP-DNA de  $\phi 29$ .

En todas las reacciones las cantidades indicadas de DNA polimerasa y TP fueron preincubadas durante 30 min a 4 °C.



# Resultados





# Capítulo 1

---

**Organización de la replicación del bacteriófago  $\phi 29$  *in vivo*.  
Implicación del dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$  en la  
localización subcelular de la maquinaria replicativa viral.**

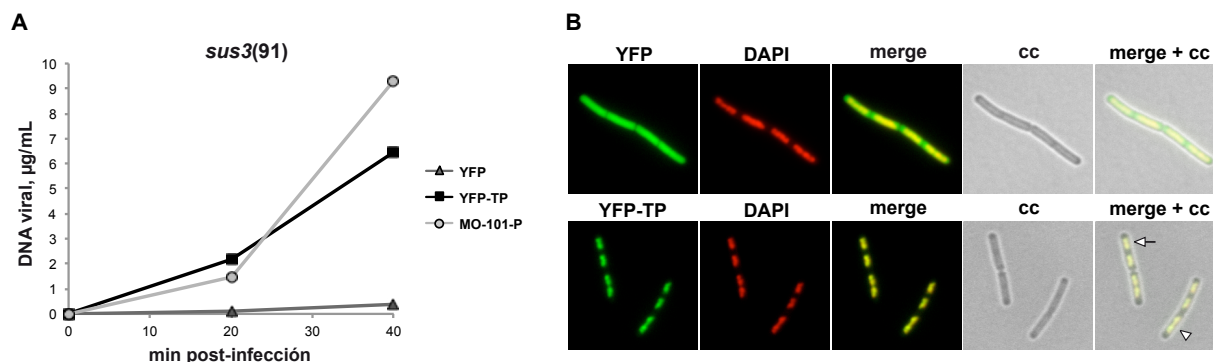
---



El bacteriófago  $\phi 29$  constituye un organismo modelo excelente para el estudio del proceso infectivo de *B. subtilis*, debido al extenso conocimiento que se tiene sobre este virus. Así, se dispone de un inventario casi completo de las proteínas codificadas por su genoma, cuya función ha sido ampliamente caracterizada *in vitro*, y han sido estudiados en profundidad el mecanismo de encapsidación del DNA y la estructura del virión (Anderson and Reilly, 1993; Meijer *et al.*, 2001a; Peterson *et al.*, 2001; Grimes *et al.*, 2002). Para romper las distancias de conocimiento entre la actividad de las proteínas virales *in vitro* y su función celular es importante caracterizar dónde, cuándo y cómo los procesos moleculares de la infección tienen lugar en la célula hospedadora.

### 1.1. La TP de $\phi 29$ localiza en el nucleoide de *B. subtilis* en ausencia de otros componentes virales

Como una primera aproximación para el estudio de la localización de la maquinaria replicativa de  $\phi 29$  *in vivo*, se determinó la localización subcelular de la TP, que es la proteína que actúa como cebador de la iniciación de la replicación (Peñalva and Salas, 1982; Blanco and Salas, 1984). Para ello, se construyó una fusión de la TP de  $\phi 29$  con la proteína amarilla fluorescente (YFP: *yellow fluorescent protein*, por sus siglas en inglés), quedando la expresión de la proteína de fusión resultante bajo el control de un promotor inducible por xilosa, y se transformaron células de *B. subtilis* su<sup>-</sup> con esta construcción. Para determinar la funcionalidad de la proteína de fusión YFP-TP, estas células se infectaron con el fago mutante *sus3*(91), deficiente en la síntesis de TP, y se indujo la expresión de la YFP-TP añadiendo xilosa al medio. Como se muestra en la **Figura 10A**, la proteína de fusión YFP-TP es funcional, ya que su expresión complementa la infección con el fago mutante *sus3*(91), si bien la acumulación de DNA viral es algo menos eficiente que en el caso de la estirpe supresora MO-101-P. El análisis de la fluorescencia de la YFP en células de *B. subtilis* (**Figura 10B**) mostró que la proteína YFP localiza uniformemente por toda la célula. Sin embargo, la proteína de fusión YFP-TP colocaliza con el nucleoide bacteriano, como puede verse en las imágenes que combinan la señal de fluorescencia de la YFP con la del DAPI tanto en células que acaban de dividirse (nucleoides compactados; ver flecha), como en células cuyo nucleoide está siendo segregado (nucleoide extendido; ver punta de flecha). Por tanto, estos resultados muestran que la TP de  $\phi 29$  fusionada a YFP localiza en el nucleoide de *B. subtilis* en ausencia de otros componentes virales.

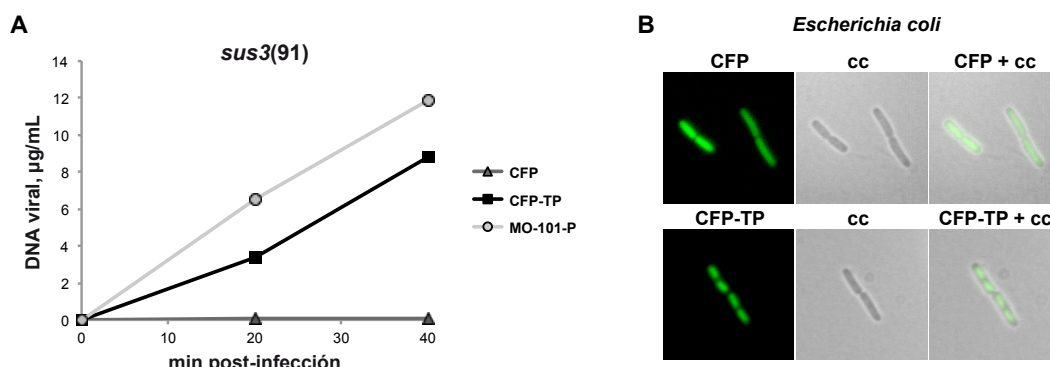


**Figura 10. Funcionalidad y localización subcelular de la proteína de fusión YFP-TP de  $\phi 29$  en *B. subtilis*.** (A) Experimentos de complementación de la infección con el fago mutante *sus3(91)* utilizando las estirpes de *B. subtilis*  $\text{su}^-$  que expresan YFP (DM-022) y YFP-TP (DM-021), y la estirpe de *B. subtilis* supresora de la mutación sin sentido del fago *sus3(91)* (MO-101-P). La expresión de las proteínas se indujo añadiendo 0,5% (p/v) xilosa (concentración final) al medio en el momento de la infección con el fago mutante *sus3(91)* a una MOI de 5, y se tomaron alícuotas de cada cultivo a los distintos tiempos post-infección indicados. El DNA viral producido en cada caso fue cuantificado por qPCR y expresado como  $\mu\text{g}$  de DNA viral por mL de cultivo. (B) Las estirpes de *B. subtilis* que expresan YFP (DM-022) y YFP-TP (DM-021) se crecieron a 37 °C en medio LB, se indujo la expresión de las proteínas añadiendo 0,5% (p/v) xilosa (concentración final) al medio y se analizó la señal de fluorescencia a los 30 min después de la inducción. Se muestra la señal de fluorescencia de YFP y DAPI, el campo claro (cc), la combinación de ambas señales de fluorescencia (*merge*), y la combinación de ambas señales de fluorescencia con el cc. Para facilitar la visualización de las imágenes, las señales de YFP y DAPI se muestran en color verde y rojo, respectivamente. La flecha señala un nucleóide compactado, en etapas tempranas del ciclo celular, y la punta de flecha señala un nucleóide extendido, en etapas intermedias del ciclo celular.

### 1.2. La TP de $\phi 29$ localiza en el nucleóide de *E. coli* en ausencia de otros componentes virales

Para determinar si la localización de la TP de  $\phi 29$  en el nucleóide bacteriano podía tener lugar en un contexto celular diferente al del hospedador natural del fago, se construyó una fusión de la TP de  $\phi 29$  con la CFP (*cyan fluorescent protein*, por sus siglas en inglés), quedando la expresión de la proteína de fusión resultante bajo el control de un promotor inducible por IPTG, y se analizó su expresión en células de *E. coli*. Para determinar la funcionalidad de la proteína de fusión CFP-TP, esta construcción se transformó en células de *B. subtilis*  $\text{su}^-$  que se infectaron con el fago mutante *sus3(91)* y se indujo la expresión de la CFP-TP añadiendo IPTG al medio. Como se muestra en la **Figura 11A**, la proteína de fusión CFP-TP es funcional, ya que su expresión complementa la infección con el fago mutante *sus3(91)*, si bien la acumulación de DNA viral es algo menos eficiente que en el caso de la estirpe supresora MO-101-P. La **Figura 11B** muestra que, en *E. coli*, la CFP localiza distribuyéndose por toda la longitud celular, mientras que la proteína de fusión CFP-TP localiza en el nucleóide bacteriano. En este experimento no se utiliza DAPI, puesto que los espectros de absorción y emisión del DAPI y la CFP solapan parcialmente. Así, la colocalización de la señal de la CFP con el nucleóide bacteriano puede inferirse a partir de las imágenes de campo claro, en las que el nucleóide aparece como una región más

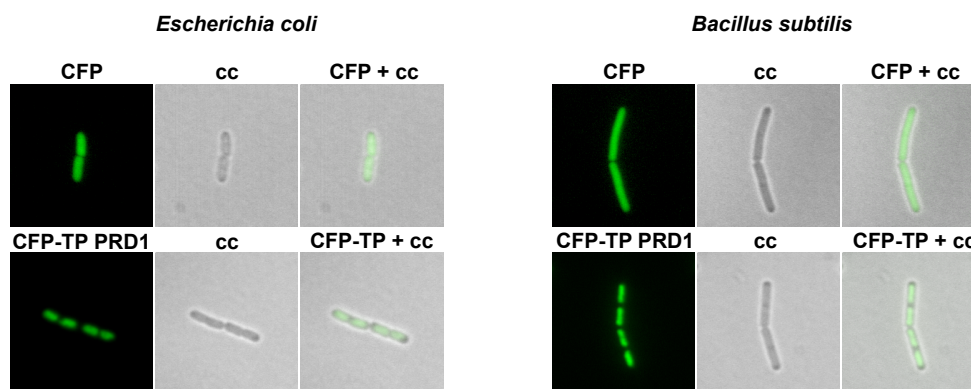
clara en comparación con los polos celulares y los futuros sitios de división. Por tanto, estos resultados muestran que la TP de  $\phi 29$  localiza en el nucleóide en células de *E. coli*, de manera independiente de otros componentes virales.



**Figura 11. Funcionalidad de la proteína de fusión CFP-TP de  $\phi 29$ , y localización subcelular en *E. coli*.** (A) Experimentos de complementación de la infección con el fago mutante *sus3(91)* a una MOI de 5 utilizando las estirpes de *B. subtilis* su<sup>-</sup> que expresan CFP (DM-024) y CFP-TP (DM-025), y la estirpe de *B. subtilis* supresora de la mutación sin sentido del fago *sus3(91)* (MO-101-P). La expresión de las proteínas se indujo añadiendo 1 mM IPTG (concentración final) al medio en el momento de la infección, y se tomaron alícuotas de cada cultivo a los distintos tiempos post-infección indicados. El DNA viral producido en cada caso fue cuantificado por qPCR y expresado como µg de DNA viral por mL de cultivo. (B) Las estirpes de *E. coli* que expresan CFP (DM-049) y CFP-TP (DM-050) se crecieron a 37 °C en medio LB, se indujo la expresión de las proteínas añadiendo 1 mM IPTG (concentración final) al medio y se analizó la señal de fluorescencia 30 min después de la inducción. Se muestra la señal de fluorescencia de CFP, el campo claro y el *merge* de CFP con el campo claro. Para facilitar la visualización de las imágenes, la señal de CFP se muestra en color verde. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Daniel Muñoz-Espín.

### 1.3. La TP del fago PRD1 localiza en el nucleóide de *E. coli* y de *B. subtilis* en ausencia de otros componentes virales

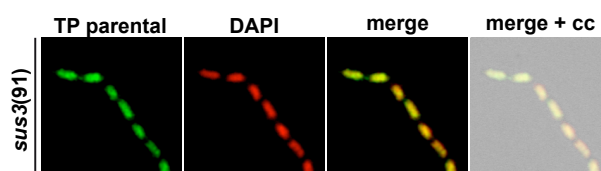
Con el fin de estudiar si otras TP de fagos localizan en el nucleóide bacteriano, se realizó una fusión de la TP del fago PRD1, que utiliza el mismo mecanismo de replicación que  $\phi 29$  e infecta la bacteria *E. coli*, con la proteína fluorescente CFP, y se analizó su localización subcelular tanto en células de *E. coli* como en células de *B. subtilis*. La **Figura 12** muestra que la TP del fago PRD1 fusionada a CFP localiza tanto en el nucleóide de su hospedador natural como en el nucleóide de *B. subtilis*, de manera independiente de otras proteínas virales. Esto, junto con los resultados obtenidos para la TP de  $\phi 29$ , sugiere que la propiedad de localizar en el nucleóide bacteriano está conservada en las TP de bacteriófagos.



**Figura 12. Localización subcelular de la proteína de fusión CFP-TP del fago PRD1 en *E. coli* y en *B. subtilis*.** Las estirpes de *E. coli* que expresan CFP (DM-049) y CFP-TP PRD1 (DM-051), y las estirpes de *B. subtilis* que expresan CFP (DM-024) y CFP-TP PRD1 (DM-060) se crecieron a 37 °C en medio LB, se indujo la expresión de las proteínas con 1 mM IPTG (concentración final) y se analizó la señal de fluorescencia 30 min después de la adición del inductor. Se muestra la señal de fluorescencia de CFP, el campo claro y el *merge* de CFP con el campo claro.

### 1.4. La TP parental de $\phi 29$ localiza en el nucleóide bacteriano independientemente de la TP iniciadora

La proteína de fusión YFP-TP sería equivalente a la TP iniciadora, ya que se encuentra en forma libre y no covalentemente unida al DNA viral. Para determinar la localización subcelular de la TP parental de  $\phi 29$  de manera independiente de la TP iniciadora, se infectaron células de *B. subtilis* su<sup>-</sup> con el fago mutante *sus3*(91) a alta multiplicidad de infección (MOI 25) con el objeto de tener suficientes moléculas de TP-DNA por célula para que la TP parental pueda ser detectada con anticuerpos específicos mediante técnicas de inmunofluorescencia. Como control de la especificidad del anticuerpo utilizado, no se detectó ninguna señal de inmunofluorescencia en células no infectadas (no mostrado). Como puede verse en la **Figura 13**, en ausencia de TP iniciadora, la TP parental colocaliza con el nucleóide bacteriano.

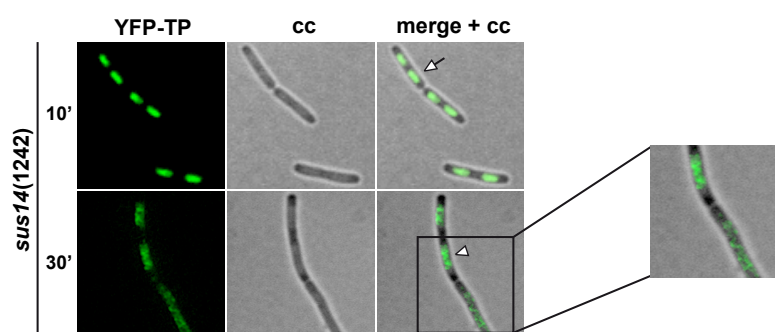


**Figura 13. Localización subcelular de la TP parental de  $\phi 29$  en células de *B. subtilis* mediante inmunofluorescencia.** La estirpe de *B. subtilis* su<sup>-</sup> 110NA fue crecida a 37 °C en medio LB suplementado con 5 mM MgSO<sub>4</sub>. A una DO<sub>600</sub> de ~0,4 el cultivo fue dividido en dos, una mitad fue infectada con el fago *sus3*(91) a una MOI de 25 y la otra mitad se dejó sin infectar como control de la especificidad de los anticuerpos (no mostrado). Las muestras se tomaron 15 minutos después de la infección y fueron procesadas para la inmunodetección, como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra la señal de inmunofluorescencia de la TP parental de  $\phi 29$  y la señal de fluorescencia del DAPI, así como el *merge* de ambas señales y el *merge* de ambas señales de fluorescencia con el campo claro. Para facilitar la visualización de las imágenes, la señal de inmunofluorescencia de la TP se muestra en verde y la señal de fluorescencia del DAPI en rojo.



### 1.5. Localización subcelular de la TP de $\phi 29$ durante el ciclo infectivo

Con el objeto de determinar la localización subcelular de la TP de  $\phi 29$  durante el ciclo infectivo, se expresó la fusión YFP-TP en células de *B. subtilis*  $su^-$ , y se infectaron con el fago *susI4*(1242), que presenta un retraso en la lisis celular, pero cuya infección es similar a la del fago *wild-type* (Carrascosa *et al.*, 1976; Steiner *et al.*, 1993). La **Figura 14** muestra que la YFP-TP colocaliza con el nucleoide bacteriano tanto a tiempos tempranos (10 min) como tardíos (30 min) post-infección, y que, al igual que ocurría en células sin infectar, su localización sigue la distribución del nucleoide bacteriano (ver flecha y punta de flecha). Estos resultados concuerdan con datos de Meijer *et al.*, (2000), en los que la TP producida durante la infección con un fago *susI4*(1242), detectada mediante inmunofluorescencia, colocaliza con el nucleoide bacteriano a lo largo de todo el ciclo infectivo. Por tanto, la localización de la proteína de fusión YFP-TP refleja el patrón de localización de la TP nativa. En etapas intermedias del ciclo celular, en las que la célula está creciendo longitudinalmente y el nucleoide está siendo segregado, la TP adquiere un patrón de distribución tipo helicoidal (ver ampliación **Figura 14**).



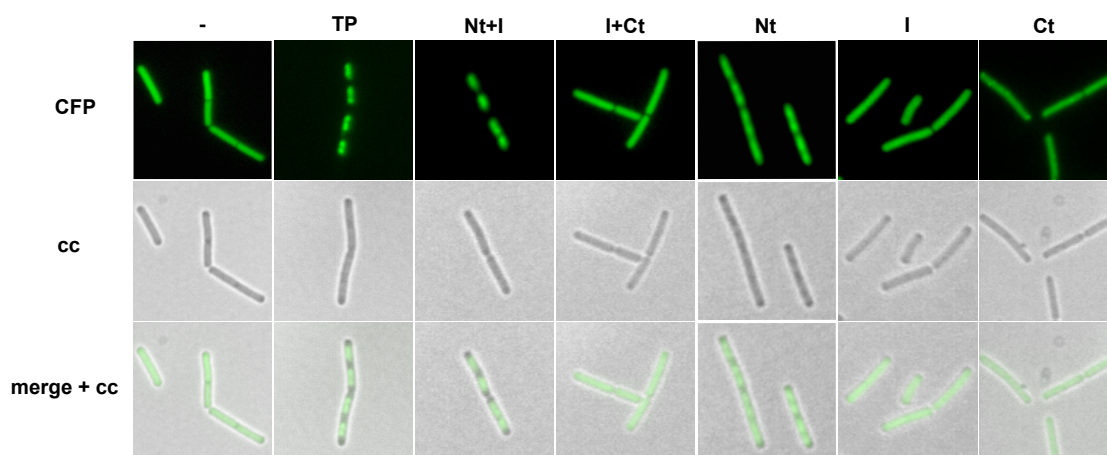
**Figura 14. Localización subcelular de la proteína de fusión YFP-TP de  $\phi 29$  durante el ciclo infectivo.** La estirpe de *B. subtilis*  $su^-$  que expresa YFP-TP (DM-021) se creció a 37° C en medio LB con 2% (p/v) glucosa y 5 mM  $MgSO_4$ . A una  $DO_{600}$  de  $\sim 0,4$  se añadió 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final) al medio y se infectó con el fago *susI4*(1242) a una MOI de 5. Se muestra la señal de fluorescencia de la YFP, el campo claro y el *merge* de YFP con el campo claro a los tiempos post-infección indicados. La señal de fluorescencia de la YFP a 30 min post-infección se muestra deconvolucionada para facilitar la visualización del patrón helicoidal. La flecha señala un nucleoide compactado, en etapas tempranas del ciclo celular, y la punta de flecha señala un nucleoide extendido, en etapas intermedias del ciclo celular. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Daniel Muñoz-Espín.

### 1.6. El dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ es el responsable de su localización en el nucleoide bacteriano

Como se ha mencionado en la Introducción, la estructura cristalográfica del heterodímero formado entre la DNA polimerasa y la TP mostró que la TP tiene una estructura alargada en tres dominios: el dominio N-terminal (residuos 1-73), el dominio intermedio (residuos 74-172) y el dominio C-terminal o dominio iniciador (residuos 173-266) (Kamtekar *et al.*, 2006). Para determinar

## Resultados

qué dominio o dominios de la TP eran responsables de la localización de la proteína en el nucleóide bacteriano, se construyeron fusiones de cada uno de los dominios que conforman la TP con la CFP (dando lugar a las proteínas CFP-Nt, CFP-I y CFP-Ct), así como las proteínas de fusión CFP-Nt+I y CFP-I+Ct, que contienen dos dominios de la TP. Además, se utilizó la fusión de la TP completa (CFP-TP) como control positivo de la localización en el nucleóide. La **Figura 15** muestra que la proteína de fusión CFP-Nt+I localiza en el nucleóide bacteriano, al contrario de lo que sucede con la proteína de fusión CFP-I+Ct. En el caso de los dominios de la TP fusionados a CFP de forma individual, sólo localiza en el nucleóide la proteína de fusión que contiene el dominio N-terminal de la TP (CFP-Nt), si bien su localización en el nucleóide es algo menos definida que en el caso de la proteína CFP-Nt+I. El resto de las proteínas de fusión (CFP-I y CFP-Ct) presentan una localización distribuida por toda la célula. Por tanto, sólo las proteínas de fusión que contienen el dominio N-terminal tienen la capacidad de localizar en el nucleóide de *B. subtilis*. Estos resultados indican que el dominio N-terminal es el responsable de la localización de la TP en el nucleóide bacteriano, y que esta localización tiene lugar de manera independiente de otros componentes virales.

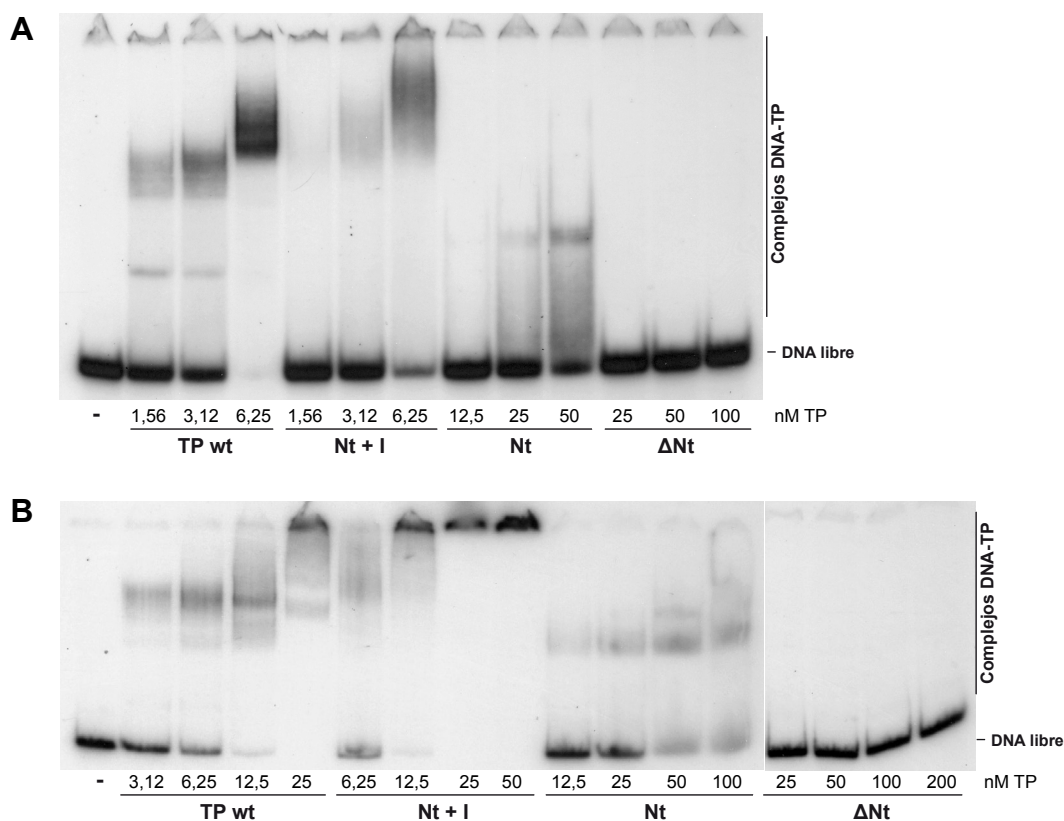


**Figura 15. Localización subcelular de los diferentes dominios de la TP de  $\phi$ 29 fusionados a CFP.** Las estirpes de *B. subtilis* que expresan CFP (DM-024), CFP-TP (DM-025), CFP-Nt+I (DM-027), CFP-I+Ct (DM-029), CFP-Nt (DM-026), CFP-I (DM-028) y CFP-Ct (DM-030) fueron crecidas en medio LB a 37 °C hasta  $DO_{600}$  de  $\sim 0,4$ , momento en el que se indujo la expresión de las proteínas añadiendo al medio 1 mM IPTG (concentración final). Las muestras fueron tomadas 30 min después de la adición del inductor y se analizó la señal de fluorescencia de cada una de ellas. Se muestra la señal de fluorescencia de la CFP, el campo claro y el *merge* de la CFP con el campo claro. Para facilitar la visualización de las imágenes, la señal de la CFP se muestra en color verde. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Daniel Muñoz-Espín.

### 1.7. El dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ se une a DNA *in vitro* de manera inespecífica de secuencia

Se sabe por estudios anteriores que la TP de  $\phi 29$  se une a dsDNA de manera inespecífica de secuencia (Garmendia *et al.*, 1988; Zaballos and Salas, 1989). Mediante la construcción de mutantes de delección de la TP, Zaballos y Salas (1989) determinaron la importancia de los residuos 13 a 18, 30 a 51 y 56 a 71 para la unión a dsDNA. Para determinar la capacidad de unión a dsDNA de los diferentes dominios que conforman la TP, se purificaron diferentes mutantes de delección de la TP conteniendo el dominio N-terminal (Nt), el dominio intermedio (I), el dominio C-terminal (Ct), el dominio N-terminal más el Intermedio (Nt+I) y el dominio Intermedio más el C-terminal (I+Ct o  $\Delta$ Nt) y se analizó la capacidad de unión a DNA de estas proteínas mediante ensayos de retraso en gel, comparándolas con la TP *wild-type*. Para ello se utilizó como sustrato un dsDNA de 68 pb correspondiente al extremo derecho del genoma de  $\phi 29$ , marcado radiactivamente (ver Materiales y Métodos) y se añadieron concentraciones crecientes de la TP *wild-type* o de la proteína indicada en cada caso. La **Figura 16A** muestra que la TP *wild-type* forma un complejo estable con el DNA, dando lugar a bandas de sustrato retrasadas de diferente movilidad. La movilidad de las bandas retrasadas disminuye a medida que aumenta la concentración de proteína, lo que indicaría que el sustrato contiene varios sitios de unión para la TP y que estos sitios van ocupándose a medida que aumenta el número de moléculas de TP añadidas en la reacción. Otro hecho alternativo pero no excluyente que podría estar teniendo lugar es el de *piggy-backing*, en el que moléculas adicionales de TP podrían estar interaccionando con TP unida al sustrato, produciendo de esta manera una menor movilidad de la banda retrasada. La proteína de delección Nt+I se une al sustrato de dsDNA de manera algo menos eficiente que la TP *wild-type*. En el caso de la proteína de delección que contiene solo el dominio N-terminal (Nt) se une al sustrato de dsDNA de manera claramente menos eficiente que la TP *wild-type*, necesitando concentraciones de proteína mayores para unirse al sustrato. Por otra parte, las proteínas I+Ct ( $\Delta$ Nt), I y Ct (no mostrado) no se unieron a DNA a ninguna de las concentraciones ensayadas, indicando que la presencia del dominio N-terminal en la TP es necesaria para la unión a dsDNA.

Por otra parte, realizamos ensayos de retraso en gel utilizando como sustrato un fragmento de dsDNA correspondiente a una región de 216 pb del genoma de *B. subtilis* (gen *yshC*). Como puede observarse en la **Figura 16B**, la TP *wild-type* se une a este sustrato de manera algo menos eficiente que a la secuencia del extremo derecho del genoma de  $\phi 29$ , debido probablemente al mayor tamaño de este sustrato. En concordancia con los resultados mostrados en la **Figura 16A**, sólo las proteínas de delección que contienen el dominio N-terminal son capaces de unirse a este DNA de *B. subtilis*. Estos resultados confirman que la TP de  $\phi 29$  se une de manera inespecífica de secuencia a dsDNA y que el dominio N-terminal es necesario y suficiente para esta unión, si bien la presencia del dominio intermedio ejerce un efecto estabilizante.

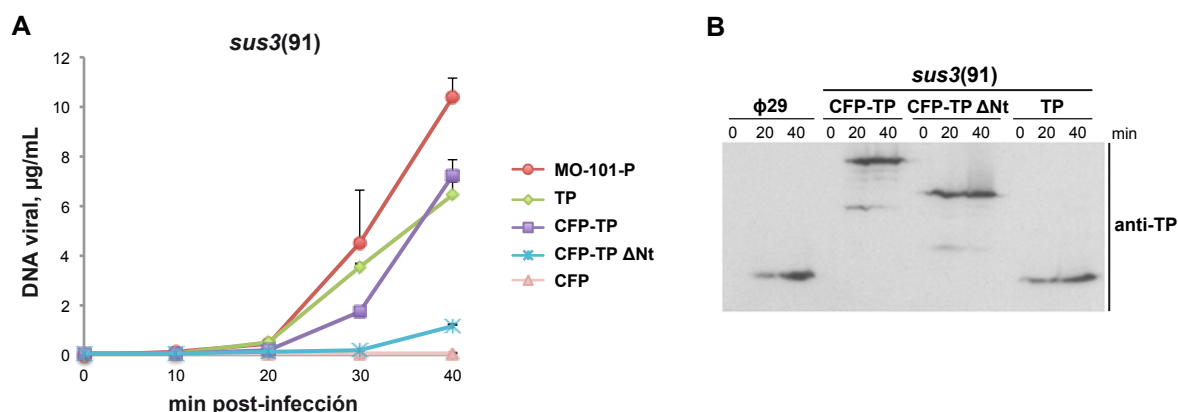


**Figura 16. Análisis de la unión a dsDNA de los diferentes dominios de la TP de  $\phi 29$  mediante ensayos de retraso en gel.** Ensayos de retraso en gel utilizando 1 nM de un sustrato de dsDNA de 68 pb correspondiente al extremo derecho del genoma de  $\phi 29$  (**A**) o de 216 pb correspondiente al gen *yshC* de *B. subtilis* (**B**) marcados en 5' con  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . Los sustratos marcados fueron incubados en ausencia (-) o en presencia de concentraciones crecientes de la proteína indicada en cada caso. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% en condiciones nativas, tras lo cual se detectó la movilidad de los diferentes complejos TP-dsDNA mediante autorradiografía.

### 1.8. El dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ es necesario para una replicación eficiente del DNA viral *in vivo*

Para determinar si el dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$  es necesario para la replicación del DNA viral *in vivo*, se llevaron a cabo experimentos de complementación de la infección con el fago mutante *sus3(91)*. Para ello, se infectaron con dicho fago estirpes de *B. subtilis*  $\text{su}^-$  que expresaban las proteínas CFP-TP, CFP- $\Delta\text{Nt}$  y CFP (como control negativo) y se cuantificó por qPCR la cantidad de DNA viral acumulado en cada estirpe a lo largo de la infección. Como control de la infección se infectó con el fago *sus3(91)* la estirpe supresora MO-101-P, así como una estirpe de *B. subtilis*  $\text{su}^-$  que expresaba la TP *wild-type*. Como puede observarse en la **Figura 17A**, se obtuvo una eficiencia de replicación (acumulación de DNA viral) similar cuando se infectaron las estirpes que expresan la TP *wild-type* y la CFP-TP, si bien la eficiencia de replicación fue mayor en el caso de la estirpe supresora

MO-101-P. Estos datos indican que, tal y como se había mostrado en la **Figura 11**, la fusión CFP-TP es funcional. Como control, En el caso de la estirpe que expresa la CFP sola no se produjo ninguna acumulación de DNA viral a lo largo del ciclo infectivo. En el caso de la estirpe que expresa la proteína de fusión CFP-ΔNt, la acumulación de DNA viral se vió muy retrasada y considerablemente reducida con respecto a la estirpe que expresa la CFP-TP. El análisis de la síntesis de estas proteínas por Western Blot determinó que los niveles de proteína expresada eran similares a los producidos en una infección con el fago  $\phi 29$  *wild-type* (**Figura 17B**).



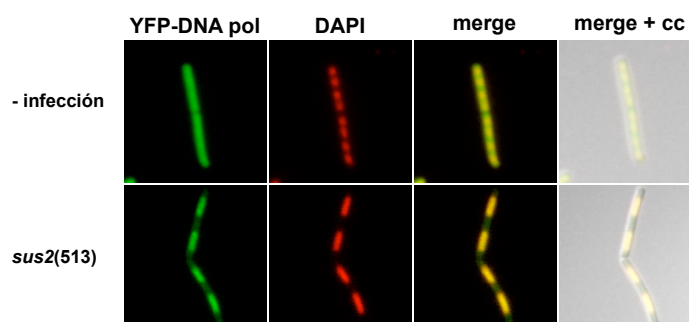
**Figura 17. Análisis de la eficiencia de replicación del fago mutante *sus3(91)* en células de *B. subtilis* que expresan CFP-TP o CFP-TP  $\Delta\text{Nt}$ .** (A) Las estirpes de *B. subtilis*  $\text{su}^-$  que expresan CFP (DM-024), CFP-TP (DM-025), CFP-TP  $\Delta\text{Nt}$  (DM-029) y TP (DM-032), y la estirpe supresora de la mutación sin sentido del fago *sus3(91)* (MO-101-P) fueron crecidas a 37 °C en medio LB suplementado con 2% glucosa y 5 mM  $\text{MgSO}_4$ . A una  $\text{DO}_{600}$  de  $\sim 0,4$  se añadió 1 mM IPTG (concentración final) al medio para inducir la expresión de las proteínas indicadas, y las estirpes fueron infectadas con el fago mutante *sus3(91)* a una MOI de 1. Se tomaron muestras a los tiempos post-infección indicados y se cuantificó la cantidad de DNA viral acumulado mediante qPCR. La cantidad de DNA viral ( $\mu\text{g}$  de DNA viral/mL de cultivo) se expresa en función del tiempo post-infección. (B) Análisis de la acumulación de proteína en las estirpes de *B. subtilis* anteriormente mencionadas por Western Blot en las condiciones anteriormente mencionadas. La expresión de TP se detectó utilizando anticuerpos específicos. Como control interno, la estirpe 168 de *B. subtilis* se infectó con el fago  $\phi 29$  *wild-type* y la acumulación de TP se analizó a los tiempos post-infección indicados. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Daniel Muñoz-Espín.

### 1.9. La TP de $\phi 29$ determina la localización de la DNA polimerasa viral en el nucleóide bacteriano, y ambas proteínas se distribuyen formando un patrón tipo helicoidal a medida que avanza el ciclo celular

Puesto que la TP y la DNA polimerasa forman un heterodímero para iniciar la replicación del DNA viral, analizamos si la DNA polimerasa localiza en el nucleóide bacteriano, como ocurre con la TP. Para ello, se realizó una fusión del gen de la DNA polimerasa viral y la YFP, y la construcción resultante (YFP-DNA pol) se transformó en células de *B. subtilis*  $\text{su}^-$ . Esta estirpe se infectó con el fago mutante *sus2(513)*, deficiente en la síntesis de la DNA polimerasa, se indujo la expresión de la proteína de fusión

## Resultados

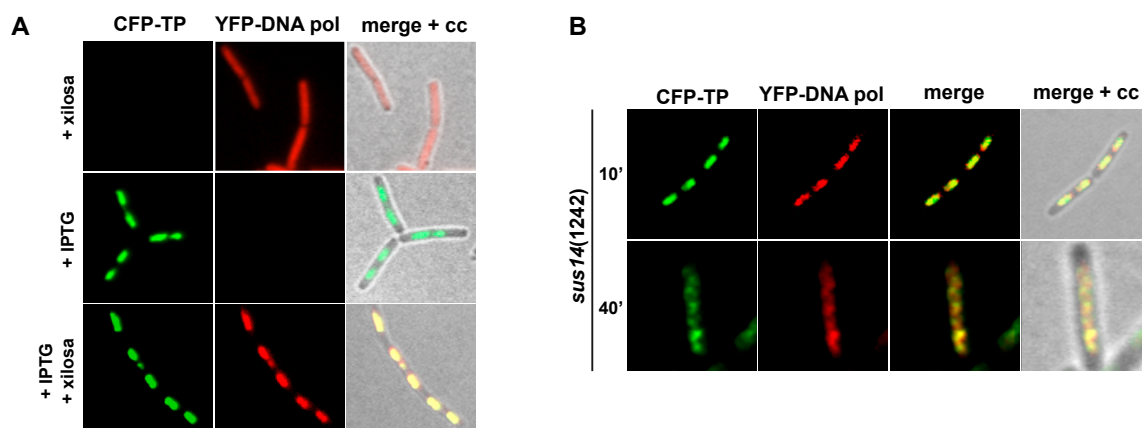
y se analizó su localización subcelular. La **Figura 18** muestra que la localización de la DNA polimerasa viral en células infectadas tiene lugar en el nucleoide bacteriano. Puesto que la DNA polimerasa localiza uniformemente por toda la longitud celular en células no infectadas (**Figura 18**) y la TP localiza en el nucleoide bacteriano de manera independiente de otros componentes virales, analizamos si la TP podría estar determinando la localización de la DNA polimerasa viral. Para ello, se utilizó una estirpe que podía expresar simultáneamente las fusiones CFP-TP y YFP-DNA pol, bajo el control de un promotor inducible por IPTG y por xilosa, respectivamente. Ambas fusiones eran funcionales, ya que la expresión de estas proteínas complementó tanto la infección de un fago mutante *sus3*(91) como la de un fago mutante *sus2*(513) (**Figura S1**). Como se muestra en la **Figura 19A**, en ausencia de expresión de la fusión CFP-TP, la YFP-DNA pol localiza uniformemente por toda la célula. Sin embargo, cuando se co-expresa con la CFP-TP, la YFP-DNA pol localiza en el nucleoide bacteriano. En resumen, estos resultados indican que la expresión de la TP promueve la localización de la DNA polimerasa en el nucleoide bacteriano.



**Figura 18. Localización subcelular de YFP-DNA pol en células de *B. subtilis* infectadas y sin infectar.** (A) La estirpe de *B. subtilis* su<sup>-</sup> que expresa YFP-DNA pol (DM-020) se creció a 37 °C en medio LB suplementado con 2% (p/v) glucosa y 5 mM MgSO<sub>4</sub>. A DO<sub>600</sub> de ~0,4 se añadió al medio 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final) para inducir la expresión de la proteína de fusión, y el cultivo fue dividido en dos. Uno de ellos fue infectado con el fago mutante *sus2*(513) a una MOI de 5 y el otro se dejó sin infectar. Las muestras se tomaron 10 min tras la adición del inductor y se analizó la señal de fluorescencia en cada caso. Se muestra la señal de fluorescencia de YFP y DAPI, así como el *merge* de ambas señales de fluorescencia y el *merge* de ambas señales de fluorescencia con el campo claro. Para facilitar la visualización de las imágenes, las señales de YFP y DAPI se muestran en color verde y rojo, respectivamente. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Daniel Muñoz-Espín.

Finalmente, con el objeto de determinar el patrón de localización de ambas proteínas simultáneamente durante el proceso infectivo, se utilizó la estirpe anteriormente mencionada y se infectó con el fago *sus14*(1242). La **Figura 19B** muestra que ambas proteínas colocalizan tanto a tiempos tempranos (10 min) como tardíos (40 min) post-infección, y que ambas siguen un patrón de distribución helicoidal en células en etapas intermedias del ciclo celular.

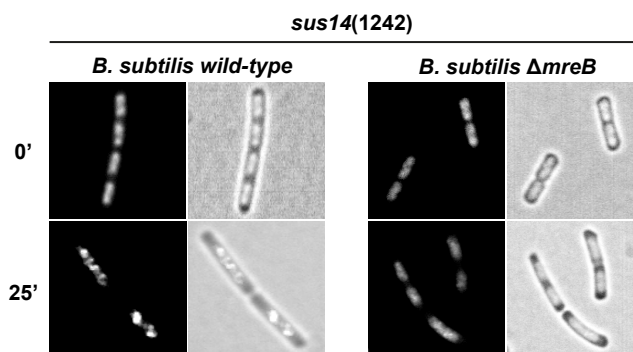




**Figura 19. Localización subcelular de YFP-DNA pol coexpresada con CFP-TP en células de *B. subtilis* infectadas y sin infectar.** (A) Localización subcelular de las proteínas CFP-TP y YFP-DNA pol expresadas simultáneamente en *B. subtilis*. La estirpe  $su^-$  DM-023 se creció a 37 °C en medio LB suplementado con 2% (p/v) glucosa y 5 mM  $MgSO_4$ . A  $DO_{600} \sim 0,4$  se añadió al medio 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final), 1 mM IPTG (concentración final), o ambos inductores, según se indica. Se muestra la señal de fluorescencia de YFP y CFP y el *merge* de ambas señales de fluorescencia con el campo claro. (B) Localización subcelular de las proteínas CFP-TP y YFP-DNA pol expresadas simultáneamente en *B. subtilis* durante la infección con el fago *sus14*(1242). La estirpe  $su^-$  DM-023 se creció a 37 °C en medio LB suplementado con 2% (p/v) glucosa y 5 mM  $MgSO_4$  hasta  $DO_{600} \sim 0,4$ , tras lo cual se añadió al medio 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final) y 1 mM IPTG (concentración final) y se infectó con el fago *sus14*(1242) a una MOI de 5. Se muestra la señal de fluorescencia de CFP y YFP, así como el *merge* de ambas señales de fluorescencia y el *merge* de ambas señales de fluorescencia con el campo claro. Para facilitar la visualización de las imágenes, las señales de CFP e YFP se muestran en color verde y rojo, respectivamente. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Daniel Muñoz-Espín.

### 1.10. La distribución tipo helicoidal de la TP de $\phi 29$ depende de la proteína del citoesqueleto bacteriano de actina MreB

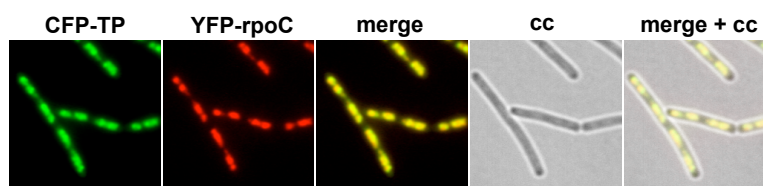
Trabajos anteriores determinaron que la distribución tipo helicoidal de la DNA polimerasa viral no ocurre en estirpes que tienen deletado el gen de la proteína MreB, Mbl o MreBH (Muñoz-Espín *et al.*, 2009). Para investigar si la distribución tipo helicoidal de la TP en etapas intermedias del ciclo celular depende de la proteína MreB, examinamos la localización subcelular de la YFP-TP en una estirpe de *B. subtilis* mutante que tiene deletado el gen *mreB*. Para que la morfología de esta estirpe sea *wild-type* y evitar así efectos secundarios derivados de una morfología celular aberrante, esta estirpe se crece en presencia de altas concentraciones de  $MgSO_4$  (ver Materiales y Métodos) (Formstone and Errington, 2005). Como se muestra en la **Figura 20**, la TP no se distribuye formando hélices en la estirpe  $\Delta mreB$ , contrariamente a lo que ocurre en la estirpe *wild-type*. Por tanto, estos resultados indican que el patrón de distribución tipo helicoidal de la TP de  $\phi 29$  depende de la presencia de la proteína bacteriana MreB.



**Figura 20. Localización subcelular de YFP-TP en células de *B. subtilis* wild-type o con el gen *mreB* deletado.** Las estirpes de *B. subtilis* su<sup>-</sup> que expresan YFP-TP en un *background* genético wild-type (DM-021) o  $\Delta mreB$  (DM-031) fueron crecidas en medio LB suplementado con 2% (p/v) glucosa y 25 mM MgSO<sub>4</sub>. A una DO<sub>600</sub> de ~0,4 se añadió al medio 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final) y las células se infectaron con el fago *sus14*(1242) a una MOI de 5, tomándose muestras a los tiempos post-infección indicados. Se muestra la señal de fluorescencia de la YFP y el *merge* de YFP con el campo claro. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Daniel Muñoz-Espín.

### 1.11. La RNA polimerasa de *B. subtilis* colocaliza con la TP de $\phi 29$ en el nucleóide bacteriano

Se sabe por estudios anteriores que la RNA polimerasa de *B. subtilis* localiza principalmente en la región del nucleóide bacteriano (Lewis *et al.*, 2000). Para determinar si la TP de  $\phi 29$  colocaliza con la RNA polimerasa de *B. subtilis* se construyeron estirpes que podían expresar simultáneamente las fusiones CFP-TP y YFP-rpoC (subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa de *B. subtilis*), bajo el control de un promotor inducible por IPTG y por xilosa, respectivamente. Como se muestra en la **Figura 21**, ambas proteínas colocalizan en el nucleóide bacteriano, siguiendo un patrón de distribución muy similar.

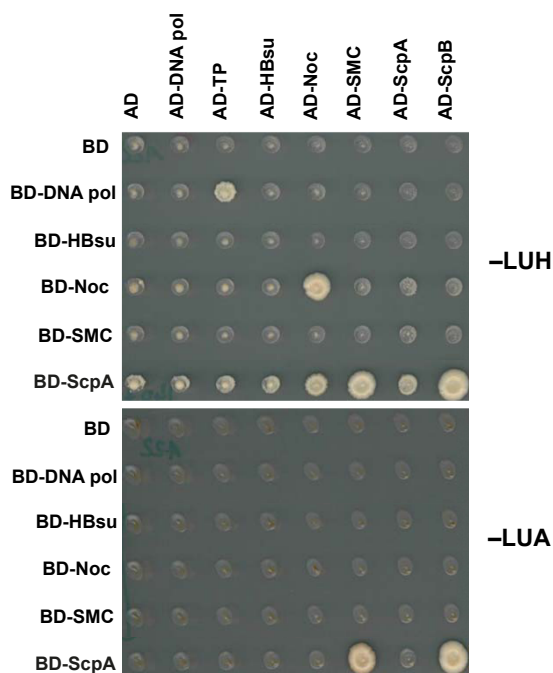


**Figura 21. Localización subcelular de CFP-TP y YFP-rpoC expresadas simultáneamente en *B. subtilis*.** La estirpe de *B. subtilis* que expresa simultáneamente las proteínas de fusión CFP-TP y YFP-rpoC (DM-033) se creció a 37 °C en medio LB. A DO<sub>600</sub> ~0,4 se añadió al medio 1 mM IPTG (concentración final) y 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final), y se tomaron muestras 30 min tras la adición de los inductores. Se muestra la señal de fluorescencia de CFP y YFP, así como el *merge* de ambas señales de fluorescencia y el *merge* de ambas señales de fluorescencia con el campo claro. Para facilitar la visualización de las imágenes, las señales de CFP y YFP se muestran en color verde y rojo, respectivamente.



### 1.12. La TP de $\phi 29$ no interacciona con las proteínas asociadas al nucleóide bacteriano HBSu, Noc, SMC y ScpA en experimentos de doble híbrido en levadura

Para analizar la posibilidad de que la localización de la TP de  $\phi 29$  en el nucleóide pudiera tener lugar mediante la interacción de ésta con alguna proteína asociada al nucleóide de *B. subtilis*, se llevaron a cabo experimentos de interacción utilizando la técnica de doble híbrido en levadura (ver Materiales y Métodos). Así, se analizó la posible interacción de la TP con las proteínas asociadas al nucleóide de *B. subtilis* HBSu, Noc, SMC y ScpA (Kohler and Marahiel, 1997; Mascarenhas *et al.*, 1998; Soppa *et al.*, 1998; Lindow *et al.*, 2002b; Wu *et al.*, 2009). Como puede observarse en la **Figura 22**, la TP no interacciona con ninguna de las proteínas analizadas mediante esta técnica. Como controles internos del experimento, se obtuvieron las interacciones TP-DNA polimerasa, Noc-Noc, SMC-ScpA, ScpA-ScpA, y ScpB-ScpA (Mascarenhas *et al.*, 2002; Soppa *et al.*, 2002; Wu and Errington, 2011) en medio sintético completo sin leucina, uracilo e histidina (–LUH). En medio sintético completo sin leucina, uracilo y adenina (–LUA), que es más restrictivo, sólo se detectaron las interacciones SMC-ScpA y ScpB-ScpA.



**Figura 22. Análisis de la interacción de la TP de  $\phi 29$  con las proteínas asociadas al nucleóide de *B. subtilis* HBSu, SMC, Noc y ScpA en experimentos de doble híbrido en levadura.** La TP de  $\phi 29$  clonada como una fusión al dominio de activación (AD) de GAL4 se utilizó para detectar la interacción con las proteínas HBSu, Noc, SMC y ScpA fusionadas al dominio de unión (BD) de GAL4. La fusión BD-TP no era funcional y por lo tanto no se ha incluido en este ensayo. La fusión BD-ScpB dio lugar a autoactivación y no se ha incluido en la figura. El ensayo se llevó a cabo por duplicado utilizando clones de levadura independientes. Este ensayo fue realizado por la Dra. Rut Carballido López.



## Capítulo 2

---

**Estudio de los residuos básicos del dominio N-terminal de la TP de  $\phi$ 29 implicados en unión a DNA y en su localización en el nucleóide bacteriano.**

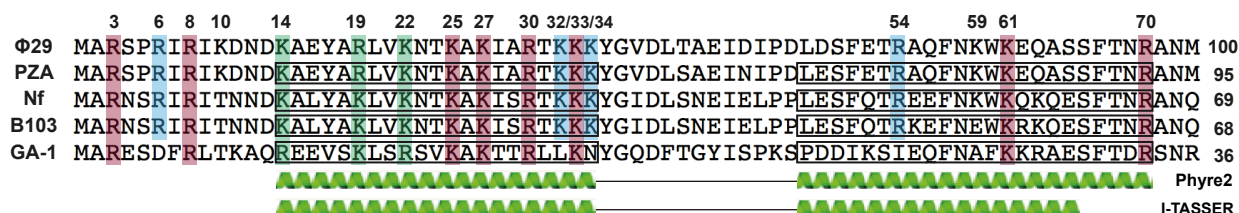
---



En ausencia de la estructura cristalográfica del dominio N-terminal, el estudio de los residuos específicos de la TP implicados en la unión a DNA depende en gran medida de abordajes como la búsqueda de residuos conservados derivados de la homología de secuencia con otras proteínas. La TP de  $\phi 29$  sólo comparte una homología de secuencia significativa con las TPs de fagos pertenecientes al género  $\phi 29$ -like, como PZA, Nf, B103 y GA-1, de las que no se tienen datos estructurales. Por otra parte, no hay proteínas en las bases de datos con suficiente homología estructural con la TP de  $\phi 29$  (Kamtekar *et al.*, 2006).

## 2.1. Determinación de la estructura secundaria del dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$

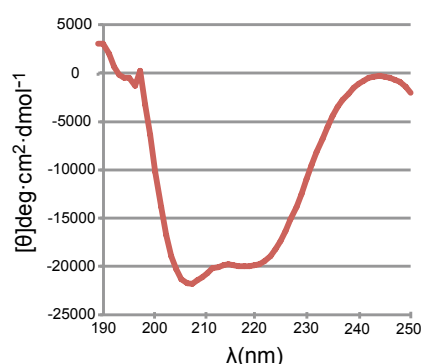
Como una primera aproximación para determinar la estructura secundaria del dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$ , se utilizaron los programas de predicción de estructura secundaria Phyre2 (*protein homology/analogy recognition engine*, por sus siglas en inglés) (Kelley and Sternberg, 2009) e I-TASSER (*iterative threading assembly refinement*, por sus siglas en inglés) (Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010). Ambos programas predijeron dos  $\alpha$ -hélices conectadas por un *loop* desordenado, al igual que ocurre para la secuencia correspondiente de los fagos PZA, Nf, B103 y GA-1. Las  $\alpha$ -hélices predichas corresponden a los residuos 14 al 34 y 48 al 70 en el caso del programa Phyre2, y a los residuos 14 al 34 y 48 al 65 en el caso del programa I-TASSER (Figura 23).



**Figura 23.** Alineamiento múltiple de secuencia del dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$  y de los fagos de *B. subtilis* pertenecientes al género  $\phi 29$ -like PZA, Nf, B103 y GA1. Las secuencias se presentan en orden de identidad de secuencia con el dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$  (los números a la derecha de las secuencias corresponden a los porcentajes de identidad relativos al dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$ ). La estructura secundaria del dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$  predicha utilizando los programas Phyre2 e I-TASSER se representa como dos  $\alpha$ -hélices conectadas por un *loop* desordenado (línea recta negra). Las cajas negras encierran los residuos de las secuencias del resto de fagos que formarían parte de las  $\alpha$ -hélices predichas utilizando el programa Phyre2. Las cajas rosas encierran los residuos conservados en todas las secuencias comparadas, las cajas verdes encierran los residuos que no son idénticos en todas las secuencias comparadas pero que conservan la carga, y las cajas azules encierran los residuos conservados en todas las secuencias comparadas excepto en la secuencia correspondiente al fago GA1. Los residuos del dominio N-terminal que han sido mutados se indican con el número correspondiente a la posición que ocupan en la secuencia de la proteína.

## Resultados

Para determinar experimentalmente el contenido en estructura secundaria del dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$ , se llevaron a cabo experimentos de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano (190-250 nm) utilizando el dominio N-terminal de la TP purificado. El fenómeno de DC se basa en la diferente absorción de una luz circularmente polarizada a derechas y una luz circularmente polarizada a izquierdas por los enlaces peptídicos de la proteína y depende de la orientación espacial de éstos (Kelly *et al.*, 2005). El espectro de DC (**Figura 24**) reveló un contenido en  $\alpha$ -hélice del 60% y un 40% de *random-coil* (estructura secundaria desordenada). El contenido en  $\alpha$ -hélice predicho utilizando los programas Phyre2 e I-TASSER fue similar al determinado por DC, siendo de un 60 y un 53%, respectivamente.



**Figura 24. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano del dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$ .** El espectro representa el promedio de 4 escaneos a una concentración de proteína de 20  $\mu\text{M}$  y una temperatura de 25  $^{\circ}\text{C}$ . El espectro presenta dos mínimos, uno a 208 nm y el otro a 222 nm, típico de una proteína con una conformación principalmente en  $\alpha$ -hélice.

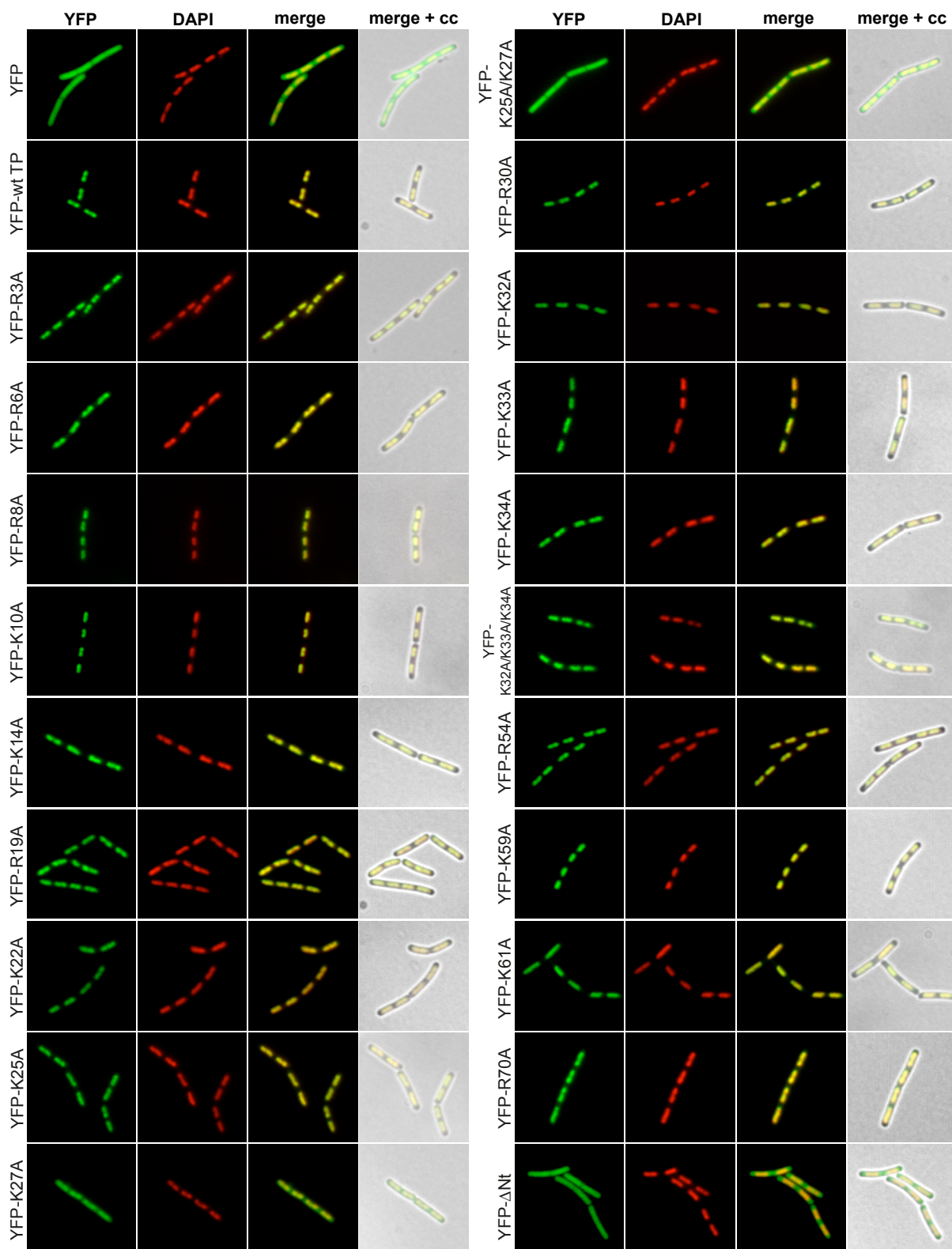
### 2.2. Determinación de los residuos básicos del dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ implicados en la localización de la TP en el nucleóide bacteriano

Puesto que la TP de  $\phi 29$  se une a DNA de manera inespecífica de secuencia, es probable que esta unión ocurra mediante interacciones electrostáticas entre aminoácidos básicos de la proteína y el esqueleto fosfato del DNA, cargado negativamente. De los 73 aminoácidos que componen el dominio N-terminal, 17 son básicos, lo que representa un 23% de los aminoácidos de este dominio. El alineamiento de secuencia del dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$  y las secuencias correspondientes de las TPs de los fagos PZA, Nf, B103 y GA-1 muestra que la mitad de los residuos básicos son idénticos entre los distintos fagos, y en el caso de ser diferentes conservan la carga (**Figura 23**). Las mayores diferencias se presentan en la secuencia correspondiente al fago GA-1, que carece de cuatro residuos básicos que se encuentran en el dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$  y del resto de fagos.

Como se ha mostrado en el Capítulo 1 de esta Tesis, la TP de  $\phi 29$  localiza en el nucleóide bacteriano tanto en células de *B. subtilis* como de *E. coli*, y el dominio N-terminal, responsable de esta localización, se une a dsDNA de manera inespecífica de secuencia *in vitro*. Estos datos sugieren

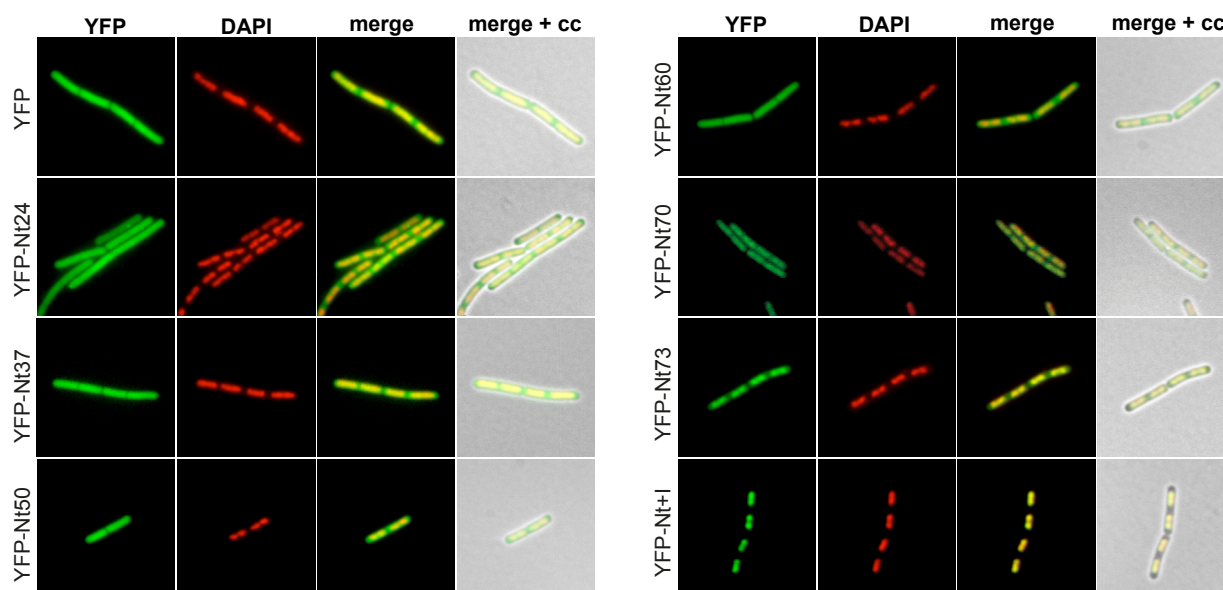
que la localización de la TP en el nucleóide bacteriano tiene lugar mediante su unión inespecífica al DNA bacteriano. Para investigar un posible papel de los residuos básicos del dominio N-terminal en la localización de la TP en el nucleóide de *B. subtilis*, se llevó a cabo una mutagénesis dirigida en este dominio, cambiando todos los residuos básicos por alanina. Así, se obtuvieron un total de 17 variantes de la proteína de fusión YFP-TP, cada una de las cuales tenía cambiado uno de los aminoácidos básicos del dominio N-terminal de la TP a alanina. Además, se obtuvo un doble y un triple mutante en dos agrupaciones de lisinas (posiciones 25 y 27 y posiciones 32 a 34). Todos los residuos básicos excepto cuatro corresponden a aminoácidos que forman parte de las  $\alpha$ -hélices putativas predichas con el programa de predicción de estructura secundaria Phyre2 citado en el apartado anterior (ver **Figura 23**). Para analizar la localización subcelular de las proteínas de fusión de las TPs mutantes en el dominio N-terminal, estas construcciones se transformaron y se expresaron en *B. subtilis*. Todas las proteínas de fusión se expresaron en niveles similares a los de la YFP-TP *wild-type* (**Figura S2**). La **Figura 25** muestra la localización subcelular de estas proteínas de fusión en células de *B. subtilis*. Como controles internos del experimento, se muestra que la YFP-TP *wild-type* localiza en el nucleóide bacteriano y tanto la YFP como la proteína de delección que carece del dominio N-terminal ( $\Delta$ Nt) localizan a lo largo de toda la célula. Todas las proteínas mutantes presentaron un patrón de localización similar al de la YFP-TP *wild-type*, a excepción de dos proteínas: YFP-K27A y YFP-K25A/K27A. En el caso de la proteína YFP-K27A, la señal de fluorescencia se distribuye por toda la célula, pero hay una acumulación de fluorescencia en el nucleóide bacteriano. En el caso de la proteína YFP-K25A/K27A, la señal de fluorescencia se encuentra distribuida de manera homogénea por toda la longitud celular, como ocurre con la YFP y la YFP- $\Delta$ Nt. Por tanto, estos resultados indican que el residuo Lys27 y la combinación de residuos Lys25 y Lys27 están implicados en la localización de la TP en el nucleóide bacteriano.

Por otra parte, para determinar la mínima secuencia aminoacídica del dominio N-terminal de la TP que es necesaria para la localización en el nucleóide bacteriano, se construyeron fusiones de la YFP a fragmentos del dominio N-terminal de la TP de diferente longitud, así como variantes de la TP completa en la que se delecionaron fragmentos de diferente longitud desde el extremo N-terminal de la proteína, y se estudió su localización subcelular en *B. subtilis*. La expresión de estas fusiones se produjo en la mayoría de los casos en niveles similares a los de la YFP-TP *wild-type* (**Figuras S2 y S3**). Los fragmentos del dominio N-terminal que contienen los residuos 1-24 (YFP-Nt24), 1-37 (YFP-Nt37), 1-50 (YFP-Nt50) y 1-60 (YFP-Nt60) no fueron suficientes para localizar en el nucleóide bacteriano (**Figura 26**). Sin embargo, el fragmento que contenía los residuos 1-70 (YFP-Nt70) presentó un patrón de localización similar al del dominio N-terminal completo (YFP-Nt73), indicando que el fragmento mínimo analizado para la localización en el nucleóide bacteriano corresponde a los 70 primeros aminoácidos de la TP. Por otro lado, las proteínas en las que se delecionaron los 10 primeros aminoácidos (YFP- $\Delta$ N10) y los 15 primeros aminoácidos (YFP- $\Delta$ N15) de la TP presentaron



**Figura 25. Localización subcelular de los mutantes de la TP de  $\phi 29$  en el dominio N-terminal fusionados a YFP.** Las estirpes de *B. subtilis* que expresan las diferentes proteínas de fusión YFP-TP se crecieron en medio LB a 37 °C y se indujo la expresión de las proteínas añadiendo al medio 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final). Las muestras se tomaron 30 min después de la adición del inductor. Se muestra la señal de fluorescencia de YFP y DAPI, así como el *merge* de ambas señales de fluorescencia y el *merge* de ambas señales con el campo claro. Para facilitar la visualización de las imágenes, las señales de YFP y DAPI se muestran en color verde y rojo, respectivamente.

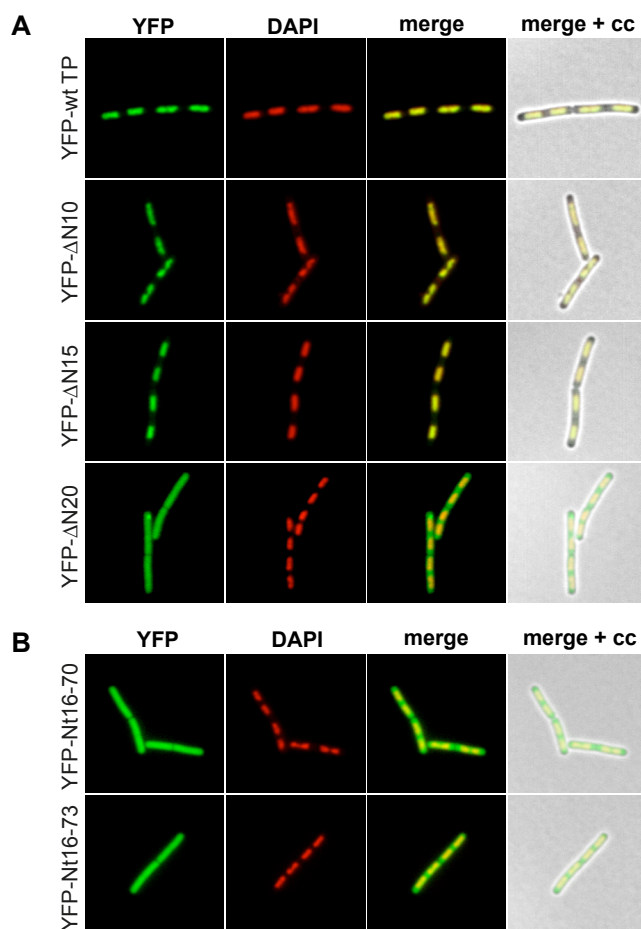




**Figura 26. Localización subcelular de los fragmentos del dominio N-terminal de la TP de  $\phi$ 29 fusionados a YFP.** Las estirpes de *B. subtilis* que expresan los diferentes fragmentos del dominio N-terminal de la TP fusionados a YFP se crecieron en medio LB a 37 °C y se indujo la expresión de las proteínas mediante la adición al medio de 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final). Las muestras se analizaron 30 min después de la adición del inductor. Se muestra la señal de fluorescencia de YFP y DAPI, así como el *merge* de ambas señales de fluorescencia y el *merge* de ambas señales de fluorescencia con el campo claro. Para facilitar la visualización de las imágenes, las señales de YFP y DAPI se muestran en color verde y rojo, respectivamente.

un patrón de localización *wild-type*, mientras que la proteína en la que se delecionaron los 20 primeros aminoácidos (YFP- $\Delta$ N20) mostró un patrón de localización disperso por todo el citoplasma celular (**Figura 27A**). Este resultado sugiere la necesidad de un plegamiento correcto de gran parte del dominio N-terminal para localizar en el nucleóide bacteriano, como puede inferirse de la predicción de estructura secundaria en la que la primera  $\alpha$ -hélice sería preservada en las proteínas de delección  $\Delta$ N10 y  $\Delta$ N15, pero no en la proteína de delección  $\Delta$ N20. Finalmente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la localización de los diferentes fragmentos del dominio N-terminal de la TP y de las TPs con distintas delecciones a partir del extremo N-terminal de la proteína, se construyeron fragmentos del dominio N-terminal de la TP que comprendían los aminoácidos 16-70 (YFP-Nt16-70) y 16-73 (YFP-Nt16-73) y se analizó su localización en *B. subtilis*. Como se observa en la **Figura 27B**, ninguno de los dos fragmentos fue suficiente para la localización en el nucleóide bacteriano.

En conjunto, estos resultados indican que el dominio mínimo de la TP ensayado para la localización en el nucleóide bacteriano comprende los aminoácidos 1 a 70, y que los 15 primeros aminoácidos de la proteína son dispensables en la TP completa para la localización en el nucleóide.

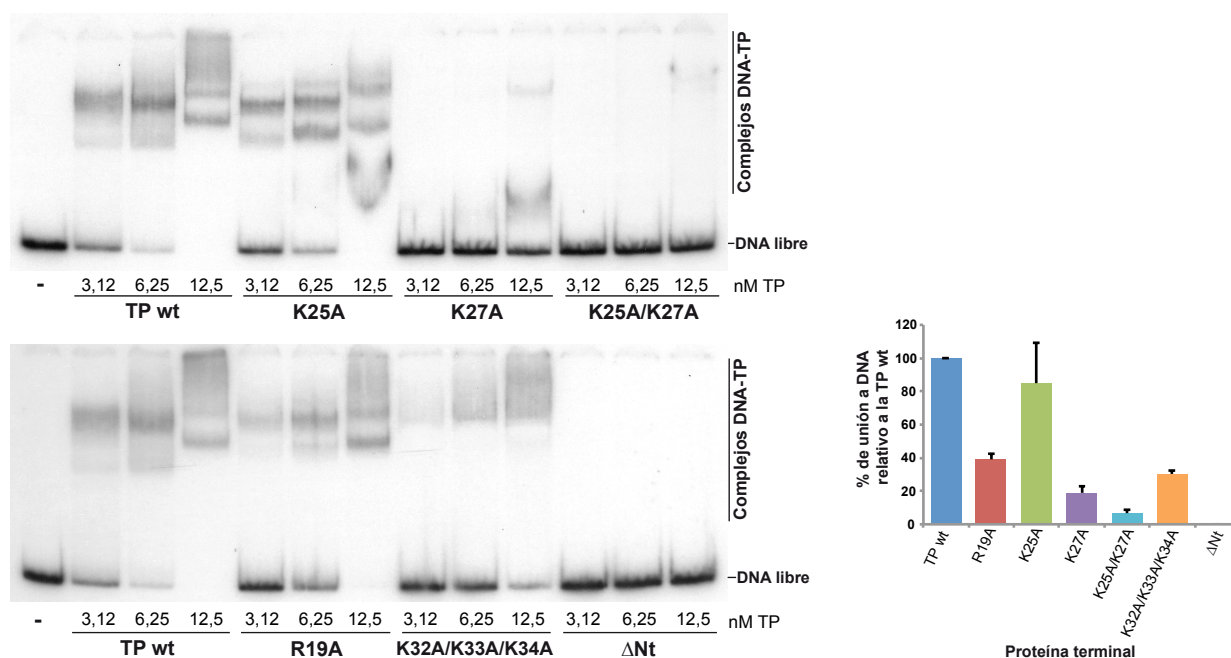


**Figura 27. Localización subcelular de las proteínas de delección  $\Delta$ N10,  $\Delta$ N15 y  $\Delta$ N20 de la TP de  $\phi$ 29 fusionadas a YFP y de los fragmentos Nt16-70 y Nt16-73 fusionados a YFP.** (A) Las estirpes de *B. subtilis* que expresan las proteínas YFP-TP *wild-type*, YFP- $\Delta$ N10, YFP- $\Delta$ N15 y YFP- $\Delta$ N20 se crecieron en medio LB a 37 °C y se indujo la expresión de las proteínas mediante la adición al medio de 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final). Las muestras se analizaron 30 min después de la adición del inductor. (B) Las estirpes de *B. subtilis* que expresan los fragmentos del dominio N-terminal 16-70 y 16-73 fusionados a YFP se crecieron y se indujo la expresión de las proteínas en las mismas condiciones que en el apartado (A). Se muestra la señal de fluorescencia de YFP y DAPI, así como el *merge* de ambas señales de fluorescencia y el *merge* de ambas señales de fluorescencia con el campo claro. Para facilitar la visualización de las imágenes, las señales de YFP y DAPI se muestran en color verde y rojo, respectivamente.

### 2.3. Efecto de las mutaciones en residuos básicos del dominio N-terminal de la TP de $\phi$ 29 en la unión a DNA *in vitro*

Para determinar si la pérdida parcial o total de localización en el nucleóide de las TPs mutantes YFP-K27A y YFP-K25A/K27A, respectivamente, era debida a un defecto de unión a DNA, se llevaron a cabo ensayos de retraso en gel utilizando el mismo sustrato de dsDNA utilizado en los experimentos de la **Figura 16B**. Para ello, se purificaron las proteínas mutantes TP K25A, TP K27A y TP K25A/K27A, y la TP *wild-type*. Además, se purificaron las proteínas TP R19A y TP K32A/K33A/K34A como controles adicionales para evaluar la correlación que existe entre la localización de la TP en el nucleóide bacteriano y su unión a DNA. Puesto que las proteínas se purificaron unidas al *Strep-tag* (ver Materiales y Métodos), analizamos en primer lugar si la presencia de este *tag* influía en la capacidad de unión de la TP *wild-type* a DNA. La **Figura S4** muestra que la presencia del *Strep-tag* no afecta de manera significativa la capacidad de unión de la TP a dsDNA. Como puede observarse en la **Figura 28**, la TP *wild-type* retrasa todo el sustrato de dsDNA a una concentración de proteína de 12,5 nM. A esta concentración sólo las TPs mutantes R19A y K25A producen un retraso completo del sustrato utilizado,

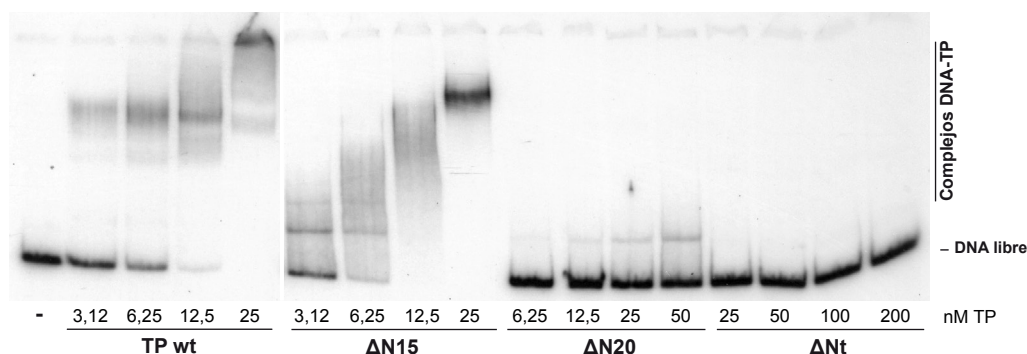
si bien en el caso de la TP K25A se obtiene una banda retrasada de menor movilidad que no se obtiene en el caso de la TP *wild-type*. A concentraciones menores de proteína se pone de manifiesto que la capacidad de unión a DNA del mutante R19A es menor que la de la TP *wild-type* (alrededor de un 40% de la unión de la TP *wild-type*). El mutante K25A se une a DNA de manera ligeramente menos eficiente (85%) que la TP *wild-type*. En el caso de la TP mutante K23A/K33A/K34A, tiene una capacidad de unión reducida (30%) comparada con la TP *wild-type*, aunque se observa un claro retraso del sustrato a la mayor concentración de proteína ensayada. Los mutantes K27A y K25A/K27A fueron los más afectados en la unión a DNA (19 y 7%, respectivamente), ya que sólo se produjo un retraso muy leve del sustrato a la mayor concentración de proteína ensayada. En las condiciones ensayadas no se detectó una unión estable entre el mutante de delección  $\Delta Nt$  y el sustrato de dsDNA, de acuerdo con los resultados mostrados en la **Figura 16** del Capítulo 1. El análisis de la unión de la TP *wild-type*, el mutante de delección  $\Delta Nt$ , y las TPs mutantes K25A y K27A a un sustrato de ssDNA, reportó resultados similares a los obtenidos con dsDNA, de acuerdo con un modo de unión a DNA inespecífico de secuencia (**Figura S5**).



**Figura 28. Unión de los mutantes de la TP de  $\phi 29$  en el dominio N-terminal a dsDNA *in vitro*.** Ensayo de retraso en gel utilizando 1 nM de un sustrato de dsDNA de 216 pb correspondiente al gen *yshC* de *B. subtilis* marcado en 5' con  $[\gamma^{32}P]$ ATP. El sustrato marcado se incubó en ausencia (-) o en presencia de concentraciones crecientes de la proteína indicada en cada caso. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% en condiciones nativas, tras lo cual se detectó la movilidad de los diferentes complejos TP-dsDNA mediante autorradiografía. El gráfico de barras muestra el porcentaje relativo de unión de cada TP mutante con respecto a la TP *wild-type* (las columnas representan la media y las barras de error la desviación estándar obtenida a partir de tres experimentos independientes).

## Resultados

Asimismo, analizamos la capacidad de unión a dsDNA de las proteínas TP  $\Delta$ N15 y TP  $\Delta$ N20, comparándola con la de la TP *wild-type* y el mutante de delección  $\Delta$ Nt. Como puede observarse en la **Figura 29**, la TP  $\Delta$ N15 se une a dsDNA de manera ligeramente más eficiente que la TP *wild-type*, aunque dando lugar a un patrón de bandas retrasadas diferente al de la TP *wild-type*. Por el contrario, en el caso de la TP  $\Delta$ N20 la capacidad de unión a dsDNA se vió altamente reducida, produciéndose sólo un ligero retraso a concentraciones de proteína mayores que las utilizadas en el caso de la TP *wild-type*.

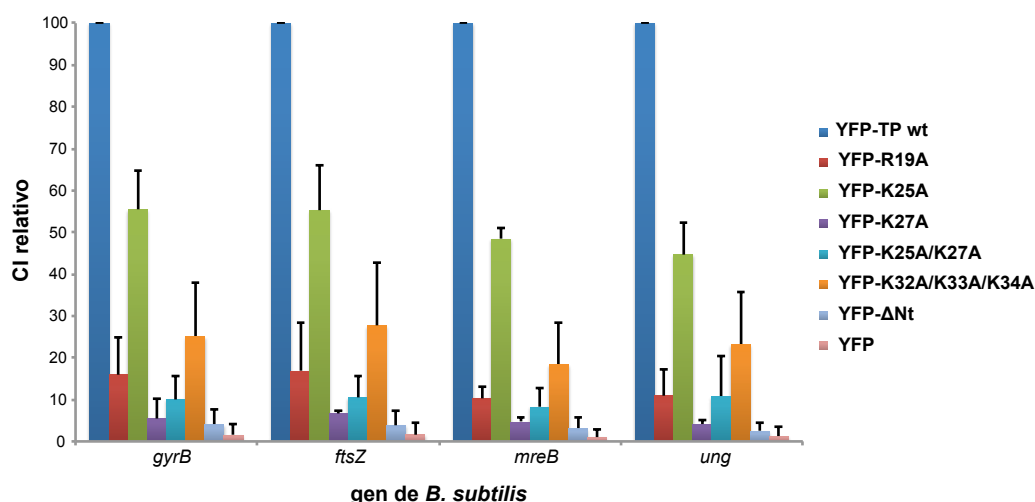


**Figura 29. Unión de los mutantes de delección de la TP de  $\phi$ 29  $\Delta$ N15,  $\Delta$ N20 y  $\Delta$ Nt a dsDNA *in vitro*.** Ensayo de retraso en gel utilizando 1 nM de un sustrato de dsDNA de 216 pb correspondiente al gen *ysbC* de *B. subtilis* marcado en 5' con [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP. El sustrato marcado se incubó en ausencia (-) o en presencia de concentraciones crecientes de la proteína indicada en cada caso. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% en condiciones nativas, tras lo cual se detectó la movilidad de los diferentes complejos TP-dsDNA mediante autorradiografía.

### 2.4. La TP de $\phi$ 29 se une al DNA genómico de *B. subtilis* *in vivo*. Efecto de las mutaciones en residuos básicos del dominio N-terminal de la TP de $\phi$ 29 en la unión a DNA *in vivo*

Para investigar la importancia del residuo Lys27 y la combinación de residuos Lys25 y Lys27 para la unión a DNA *in vivo*, se utilizó la técnica de inmunoprecipitación de cromatina entrecruzada (X-ChIP: del inglés *cross-linked chromatin immunoprecipitation*) con formaldehído, tal y como se describe en Materiales y Métodos. De manera resumida, se crecieron células de *B. subtilis* que expresaban las proteínas de fusión YFP-TP *wild-type*, YFP-R19A, YFP-K25A, YFP-K27A, YFP-K25A/K27A, YFP-K32A/K33A/K34A y YFP- $\Delta$ Nt en medio LB, se indujo la expresión de las proteínas de fusión con xilosa, y 1 h después se añadió formaldehído al medio durante 5 min para entrecruzar las uniones proteína-DNA. El DNA se fragmentó mediante sonicación y las moléculas de TP unidas a DNA se inmunoprecipitaron utilizando anticuerpos específicos contra la TP. Se analizó la unión a cuatro regiones (de entre 104 y 200 pb de longitud) distribuidas por el genoma de *B. subtilis*, correspondientes a los genes *gyrB*, *ftsZ*, *mreB* y *ung* (posiciones genómicas correspondientes a 0°, 136°, 244° y 333°, respectivamente). La **Figura S6** muestra que, en las condiciones en las que se

realizó el experimento, la TP *wild-type* y el resto de proteínas mutantes se expresan de manera similar. La unión de la TP a las distintas regiones del genoma de *B. subtilis* analizadas se expresó mediante el coeficiente de inmunoprecipitación (CI), que representa la cantidad de DNA inmunoprecipitado para una región determinada en función de la cantidad de DNA total de esa región en la muestra antes de la inmunoprecipitación (ver Materiales y Métodos). La **Figura 30** muestra el CI de las TPs mutantes relativo al CI de la TP *wild-type* para cada una de las regiones genómicas analizadas. En células que expresaban la YFP sola se obtuvieron CIs del 1-2% de la TP *wild-type* (100%). Así, como puede inferirse por estos datos, la TP de  $\phi 29$  se une al DNA genómico de *B. subtilis*, y la fusión de la YFP a la TP no impide la unión de ésta al DNA *in vivo*. En concordancia con los experimentos de unión a DNA *in vitro*, los mutantes más afectados en unión a DNA *in vivo* fueron los mutantes K27A y K25A/K27A, con unos CIs que oscilan entre el 4-7% y 8-11% de la TP *wild-type*, respectivamente. En el caso del mutante de delección  $\Delta Nt$  hay que mencionar que la reacción de entrecruzamiento no sería igual de eficiente que en el caso del resto de las TPs analizadas, puesto que carece de 1/3 de la proteína, por lo que el valor de CI obtenido (2-3% de la TP *wild-type*) no es comparable. Los valores de CI más altos se obtuvieron con el mutante K25A, obteniéndose CIs que oscilaban entre el 45 y el 55% de la TP *wild-type*, dependiendo de la región analizada. En el caso del mutante R19A, los valores de CI obtenidos oscilaron entre el 10 y el 17% de la TP *wild-type*, y en el caso del mutante K32A/K33A/K34A entre el 18 y el 28%. Por tanto, si bien se mantiene la misma tendencia de unión con respecto a la TP *wild-type*, la capacidad de unión a DNA de las TPs mutantes *in vivo* se encuentra más reducida que *in vitro*.



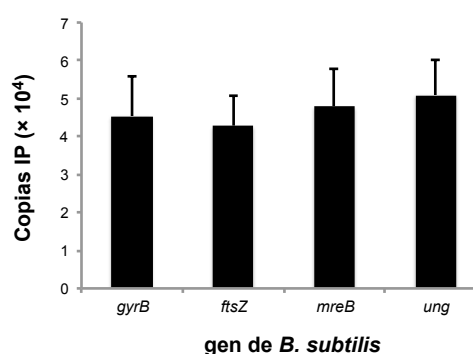
**Figura 30. Unión de los mutantes de la TP de  $\phi 29$  en el dominio N-terminal fusionados a YFP a las regiones del genoma de *B. subtilis* *gyrB*, *ftsZ*, *mreB* y *ung* *in vivo*.** Las estirpes de *B. subtilis* que expresan las proteínas de fusión indicadas se crecieron en medio LB a 30 °C, se indujo la expresión de las proteínas añadiendo al medio 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final) y se añadió formaldehído 1 h después para entrecruzar las proteínas y el DNA, durante 5 min. Las muestras se procesaron como se describe en Materiales y Métodos. El DNA inmunoprecipitado y el DNA total se cuantificaron por qPCR. La unión de la proteína al DNA se expresa como Coeficiente de Inmunoprecipitación (CI) relativo al de la TP *wild-type*. En la figura se presentan los valores de CI medios para cada proteína y la desviación estándar, obtenidos a partir de tres experimentos independientes.



## Resultados

Por otra parte, con el objeto de analizar si existía una unión preferente a alguna de las cuatro regiones del genoma de *B. subtilis* analizadas, se realizó una cuantificación absoluta de la unión de la YFP-TP *wild-type* a estas regiones. Para ello, el DNA inmunoprecipitado y el DNA total de cada región se cuantificaron por qPCR y los datos obtenidos para cada región se interpolaron a una curva patrón construida con cantidades conocidas del genoma purificado de *B. subtilis*. La unión de la YFP-TP *wild-type* al DNA se expresa como copias inmunoprecipitadas (IP) de cada fragmento  $\times 10^4$  tras aplicar la fórmula del CI (Materiales y Métodos). La **Figura 31** muestra que la YFP-TP *wild-type* se unió de manera similar a las cuatro regiones analizadas, de acuerdo con un modo de unión a DNA no específico de secuencia.

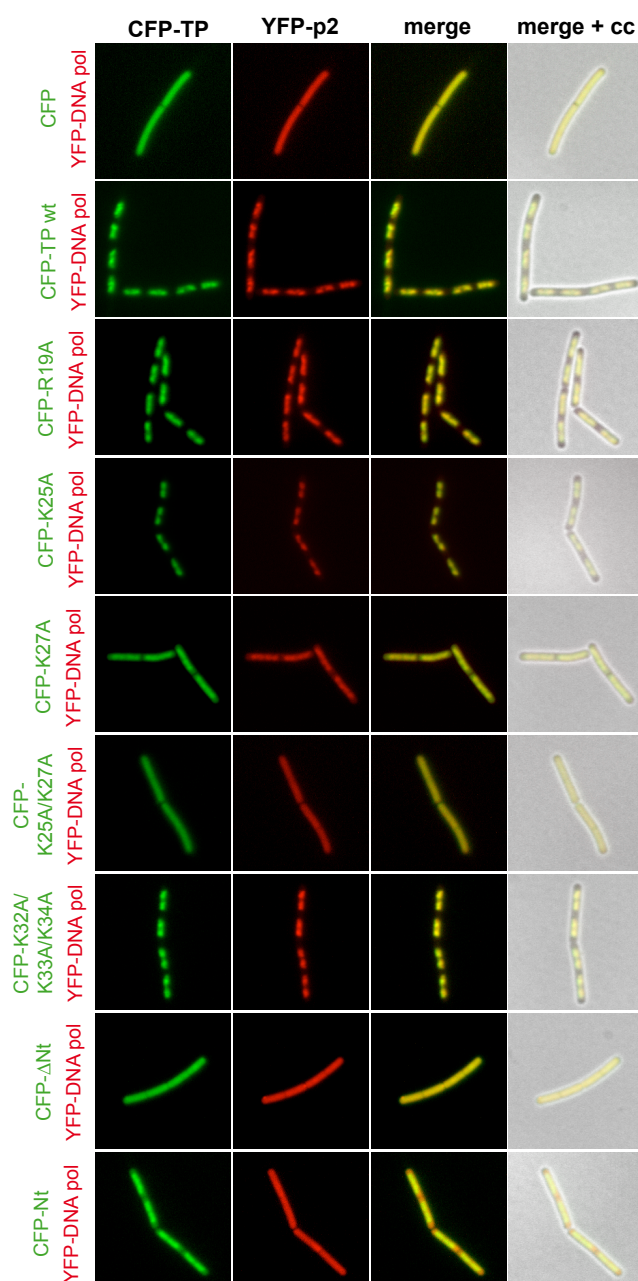
**Figura 31. Cuantificación de la unión de la YFP-TP *wild-type* de  $\phi 29$  a las regiones del genoma de *B. subtilis* *gyrB*, *ftsZ*, *mreB* y *ung* *in vivo*.** La estirpe de *B. subtilis* que expresa la YFP-TP *wild-type* se creció en medio LB a 30 °C, se indujo la expresión de la proteína añadiendo al medio 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final) y se añadió formaldehído 1 h después para entrecruzar las proteínas y el DNA, durante 5 min. Las muestras se procesaron como se describe en Materiales y Métodos. En la figura se presentan los valores medios de copias IP para cada región y la desviación estándar, obtenidos a partir de tres experimentos independientes.



### 2.5. Efecto de las mutaciones en residuos básicos del dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ en la localización de la DNA polimerasa viral

Puesto que la DNA polimerasa viral requiere la expresión de la TP para localizar en el nucleóide bacteriano (**Figura 19A**, Capítulo 1), estudiamos el efecto que las mutaciones en el dominio N-terminal de la TP tenían en la localización de la DNA polimerasa. Para ello, se construyeron estirpes de *B. subtilis* que coexpresaban la fusión YFP-DNA polimerasa (YFP-DNA pol) y la fusión CFP-TP *wild-type*, CFP-Nt, CFP- $\Delta$ Nt, o las fusiones de CFP con los diferentes mutantes de la TP en el dominio N-terminal (CFP-R19A, CFP-K25A, CFP-K27A, CFP-K25A/K27A, CFP-K32A/K33A/K34A), bajo el control de un promotor de xilosa y de IPTG, respectivamente. Como control, se construyó una estirpe que coexpresaba YFP-DNA pol y CFP. Los niveles de expresión de la fusión YFP-DNA pol fue similar en todas las estirpes y las proteínas de fusión CFP-TP *wild-type* o CFP-TP mutante se expresaron de manera similar entre ellas (**Figura S7**). Como puede observarse en la **Figura 32**, las estirpes que expresan la CFP-TP *wild-type*, CFP-R19A, CFP-K25A y CFP-K32A/K33A/K34A muestran una señal de localización de YFP-DNA pol en el nucleóide bacteriano. Por el contrario, las estirpes que

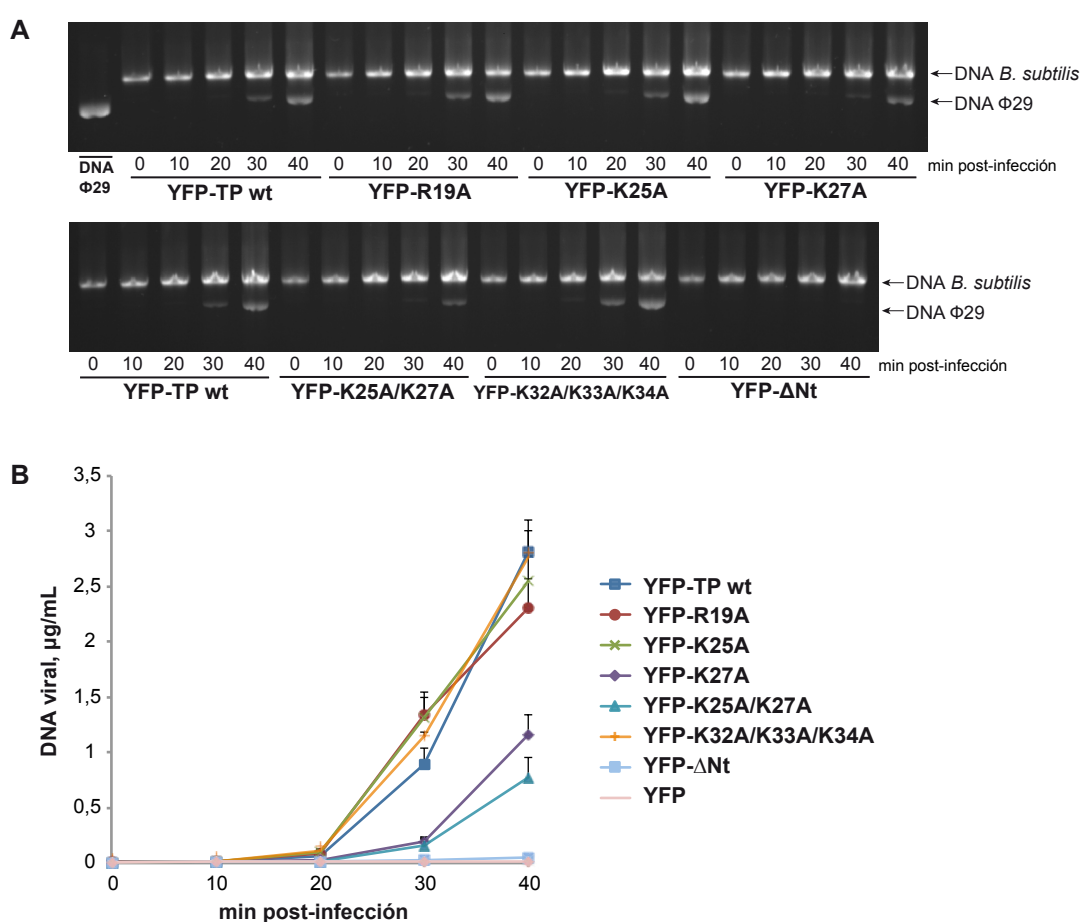
expresan CFP-K25A/K27A y CFP- $\Delta$ Nt presentan un patrón de localización de la YFP-DNA pol por toda la célula, al igual que ocurre cuando se coexpresa ésta con la CFP. En el caso de la estirpe que expresa la CFP-K27A, la YFP-DNA pol presentó un patrón de localización por toda la célula, pero con una ligera acumulación de fluorescencia en la región del nucleóide bacteriano, correspondiendo con la localización de la CFP-K27A. Por tanto, estos resultados indican que la TP “dirige” a la DNA polimerasa hacia aquella localización en la que la TP se encuentra. En el caso de la estirpe que expresa la CFP-Nt se observa que, aunque ésta localiza principalmente en el nucleóide bacteriano, la YFP-DNA pol lo hace por toda la célula, lo que indica que para que la TP pueda determinar la localización de la DNA polimerasa ambas proteínas deben interactuar, ya que la DNA polimerasa establece contactos principalmente con el dominio intermedio y el C-terminal de la TP (Kamtekar *et al.*, 2006).



**Figura 32. Análisis de la localización de la YFP-DNA pol cuando es coexpresada con las diferentes TPs mutantes en el dominio N-terminal fusionadas a CFP.** Las estirpes de *B. subtilis* que coexpresan la YFP-DNA pol y la TP *wild-type* o las diferentes TPs mutantes en el dominio N-terminal fusionadas a CFP se crecieron a 37 °C en medio LB y se indujo la expresión de las proteínas añadiendo al medio 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final) y 1 mM IPTG (concentración final). Las muestras se tomaron 30 min después de la adición de los inductores. Se muestra la señal de fluorescencia de CFP y YFP, así como el *merge* de ambas señales de fluorescencia y el *merge* de ambas señales de fluorescencia con el campo claro. Para facilitar la visualización de las imágenes, las señales de CFP y YFP se muestran en color verde y rojo, respectivamente.

### 2.6. Efecto de las mutaciones en residuos básicos del dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ en la replicación del DNA viral *in vivo*

Como se ha mostrado en el Capítulo 1, el dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$  es necesario para una replicación eficiente del DNA viral *in vivo* (ver **Figura 17A**). Para estudiar el efecto de las mutaciones introducidas en el dominio N-terminal de la TP en la replicación del DNA viral *in vivo*, se llevaron a cabo experimentos de complementación infectando las estirpes de *B. subtilis* que expresan tanto la TP *wild-type* como las TPs mutantes con el fago mutante *sus3(91)*. El análisis de la expresión de estas proteínas por *Western Blot* muestra que los niveles de proteína producidos son comparables



**Figura 33. Análisis de la eficiencia de replicación del fago mutante *sus3(91)* en células de *B. subtilis* su<sup>-</sup> que expresan la TP *wild-type* o las TPs mutantes en el dominio N-terminal fusionadas a YFP. (A y B)** Las estirpes de *B. subtilis* su<sup>-</sup> que expresan las proteínas indicadas se crecieron en medio LB a 37 °C y se indujo la expresión de las proteínas añadiendo al medio 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final). Al mismo tiempo los cultivos se infectaron con el fago mutante *sus3(91)* a una MOI de 1 y se tomaron muestras a los distintos tiempos post-infección. **(A)** La cantidad de DNA acumulado a cada tiempo post-infección se analizó en geles de agarosa al 0,6%. Las flechas indican la posición del DNA genómico de *B. subtilis* y de  $\phi 29$ . **(B)** La cantidad de DNA acumulado a cada tiempo post-infección se cuantificó por qPCR utilizando el par de oligonucleótidos R-25 y R-OUT-SUPER, que amplifican una región de 298 pb del extremo derecho del genoma de  $\phi 29$ . La cantidad de DNA viral se expresa como µg de DNA viral por mL de cultivo en función del tiempo post-infección. Se presentan la media y el error estándar de la media obtenidos a partir de tres experimentos independientes.



(Figura S8). La acumulación de DNA viral a lo largo del ciclo infectivo del fago mutante en las distintas estirpes de *B. subtilis* se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa y qPCR. Como puede observarse en la **Figura 33 A y B**, las estirpes que expresan YFP-R19A, YFP-K25A y YFP-K32A/K33A/K34A complementaron la infección con el fago mutante *sus3*(91), ya que la acumulación de DNA viral en estas estirpes fue similar a la que se produjo en la estirpe que expresa YFP-TP *wild-type*. Por el contrario, en el caso de las estirpes que expresan las proteínas YFP-K27A y YFP-K25A/K27A, la acumulación de DNA viral se vio muy reducida con respecto a la estirpe que expresa la proteína YFP-TP *wild-type*. En el caso de la estirpe que expresa YFP-ΔNt la acumulación de DNA fue despreciable, incluso a tiempos tardíos post-infección. Como control interno del experimento, en la estirpe que expresa YFP no se produjo acumulación de DNA viral. Por tanto, estos resultados indican que la unión de la TP a DNA *in vivo* es importante para una replicación eficiente del DNA viral.



## Capítulo 3

---

---

**Implicación de la capacidad de unión a DNA de la TP de  $\phi$ 29 en el mecanismo de replicación del DNA viral *in vitro*. Papel de la proteína p6 en las primeras etapas de la replicación.**

---

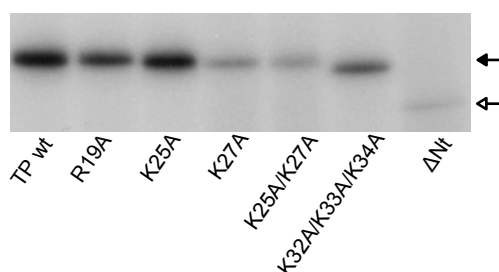
---



Estudios anteriores determinaron que el dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$  es parcialmente dispensable en la iniciación de la replicación del TP-DNA de  $\phi 29$  *in vitro* en presencia de la proteína p6 (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2007). Sin embargo, en ausencia de p6 no se produce iniciación utilizando la TP mutante que carece del dominio N-terminal  $\Delta Nt$ . Por tanto, se sugirió que el dominio N-terminal de la TP podría estar implicado en facilitar la apertura del origen de replicación, ejerciendo de esta manera una acción similar a la proteína p6. Para profundizar sobre el papel que el dominio N-terminal de la TP desempeña en la replicación del TP-DNA de  $\phi 29$  *in vitro* y estudiar si la capacidad de unión a DNA de esta proteína es importante para este proceso, analizamos el efecto de las mutaciones en el dominio N-terminal de la TP mencionadas en el capítulo anterior en la eficiencia de las diferentes etapas del proceso, esto es, iniciación, transición, replicación y amplificación.

### 3.1. Los mutantes de la TP de $\phi 29$ afectados en la unión a DNA están afectados en la iniciación de la replicación del TP-DNA viral

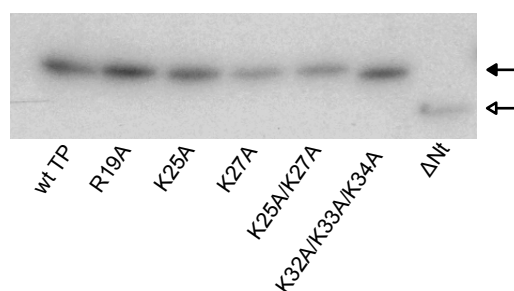
Como se ha mostrado en el capítulo anterior, las TPs mutantes en el dominio N-terminal R19A, K27A, K25A/K27A y K32A/K33A/K34A están afectadas en distinto grado en su capacidad de unión a DNA. Para determinar si la capacidad de unión a DNA tiene algún efecto en el proceso de iniciación de la replicación del TP-DNA de  $\phi 29$ , se llevaron a cabo ensayos de iniciación utilizando estas proteínas purificadas, así como la TP mutante K25A y el mutante de delección  $\Delta Nt$ , y se comparó su actividad con la de la TP *wild-type*. De esta manera, se analizó la eficiencia en la reacción de iniciación del TP-DNA de  $\phi 29$  utilizando cada una de estas TPs como iniciadoras, y se cuantificó la formación del complejo TP-dAMP en cada caso. Como puede observarse en la **Figura 34** y **Tabla I**, las TP mutante K25A muestra una eficiencia de iniciación similar a la de la TP *wild-type*. La eficiencia de iniciación de la TP R19A es ligeramente inferior a la de la TP *wild-type*. En el caso de la TP mutante K32A/K33A/K34A mostró una eficiencia de iniciación moderadamente afectada, que se vió aún más reducida en el caso de las TPs mutantes K27A y K25A/K27A y el mutante de delección  $\Delta Nt$ .



**Figura 34. Formación del complejo TP-dAMP en presencia de TP-DNA *in vitro*, utilizando la TP wt o las TPs mutantes como iniciadores.** La reacción se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos utilizando 12 nM de TP wt o mutante, 12 nM de DNA polimerasa, 1,6 nM de TP-DNA como molde y 10 mM  $MgCl_2$ . Tras 2 min de incubación a 30 °C, las muestras se procesaron como se describe en Materiales y Métodos y se analizaron por SDS-PAGE. La cuantificación se llevó a cabo mediante análisis densitométrico de las autorradiografías. La flecha negra indica la posición del complejo TP-dAMP y la flecha blanca la posición del complejo TP  $\Delta Nt$ -dAMP. La figura es representativa de tres experimentos independientes.

## Resultados

Puesto que los mutantes severamente afectados en la iniciación de la replicación del TP-DNA de  $\phi 29$  fueron aquellos que presentaban una unión a DNA muy reducida (TPs K27A, K25A/K27A y  $\Delta Nt$ ), el defecto en la reacción de iniciación podría deberse a un reconocimiento deficiente del origen de replicación por parte de estas TP's mutantes. Para analizar esta hipótesis se llevaron a cabo experimentos de iniciación en ausencia de TP-DNA, ya que la DNA polimerasa de  $\phi 29$  es capaz de realizar la reacción de deoxinucleotidilación de la TP en ausencia de molde (Blanco *et al.*, 1992). La **Figura 35** y **Tabla I** muestran que, en ausencia de TP-DNA, las TP's mutantes alcanzan niveles de iniciación más cercanos a los de la TP *wild-type*. En el caso del mutante TP  $\Delta Nt$ , aunque su eficiencia de iniciación en estas condiciones es más cercana a la TP *wild-type* que en los ensayos de iniciación con molde, sigue estando bastante afectado.



**Figura 35. Formación del complejo TP-dAMP en ausencia de TP-DNA *in vitro*, utilizando la TP wt o las TP's mutantes como iniciadores.** El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos utilizando 24 nM de TP wt o mutante, 24 nM de DNA polimerasa y 1 mM  $MnCl_2$ . Tras 1 h de incubación a 30 °C, las muestras se procesaron como se describe en Materiales y Métodos y se analizaron por SDS-PAGE. La cuantificación se llevó a cabo mediante análisis densitométrico de las autorradiografías. La flecha negra indica la posición del complejo TP-dAMP y la flecha blanca la posición del complejo TP  $\Delta Nt$ -dAMP. La figura es representativa de tres experimentos independientes.

**Tabla I. Actividades de la TP *wild-type* y las TP's mutantes en el dominio N-terminal.**

TP	Formación TP-dAMP <sup>a</sup>			Replicación TP-DNA <sup>b</sup>		Amplificación TP-DNA	
	TP-DNA		Sin molde	- p6	+ p6	%	FA
	- p6	+ p6					
TP wt	100	100	100	100	100	100	137 ± 22
R19A	75 ± 13	102 ± 10	90 ± 18	44 ± 9	93 ± 8	110 ± 8	149 ± 14
K25A	108 ± 17	115 ± 7	84 ± 0,4	89 ± 3	98 ± 2	121 ± 6	165 ± 27
K27A	21 ± 4	108 ± 7	60 ± 1	3 ± 1	73 ± 9	12 ± 3	18 ± 6
K25A/K27A	19 ± 4	116 ± 9	52 ± 2	3 ± 1	73 ± 5	13 ± 4	19 ± 8
K32A/K33A/K34A	40 ± 17	111 ± 11	71 ± 10	16 ± 5	97 ± 6	104 ± 15	140 ± 9
$\Delta Nt$	10 ± 4	109 ± 12	24 ± 5	1 ± 0,3	60 ± 5	3 ± 2	5 ± 3

<sup>a</sup>Los números indican el porcentaje medio de actividad de las TP's mutantes relativo a la TP wt y la desviación estándar, obtenidos de tres experimentos independientes.

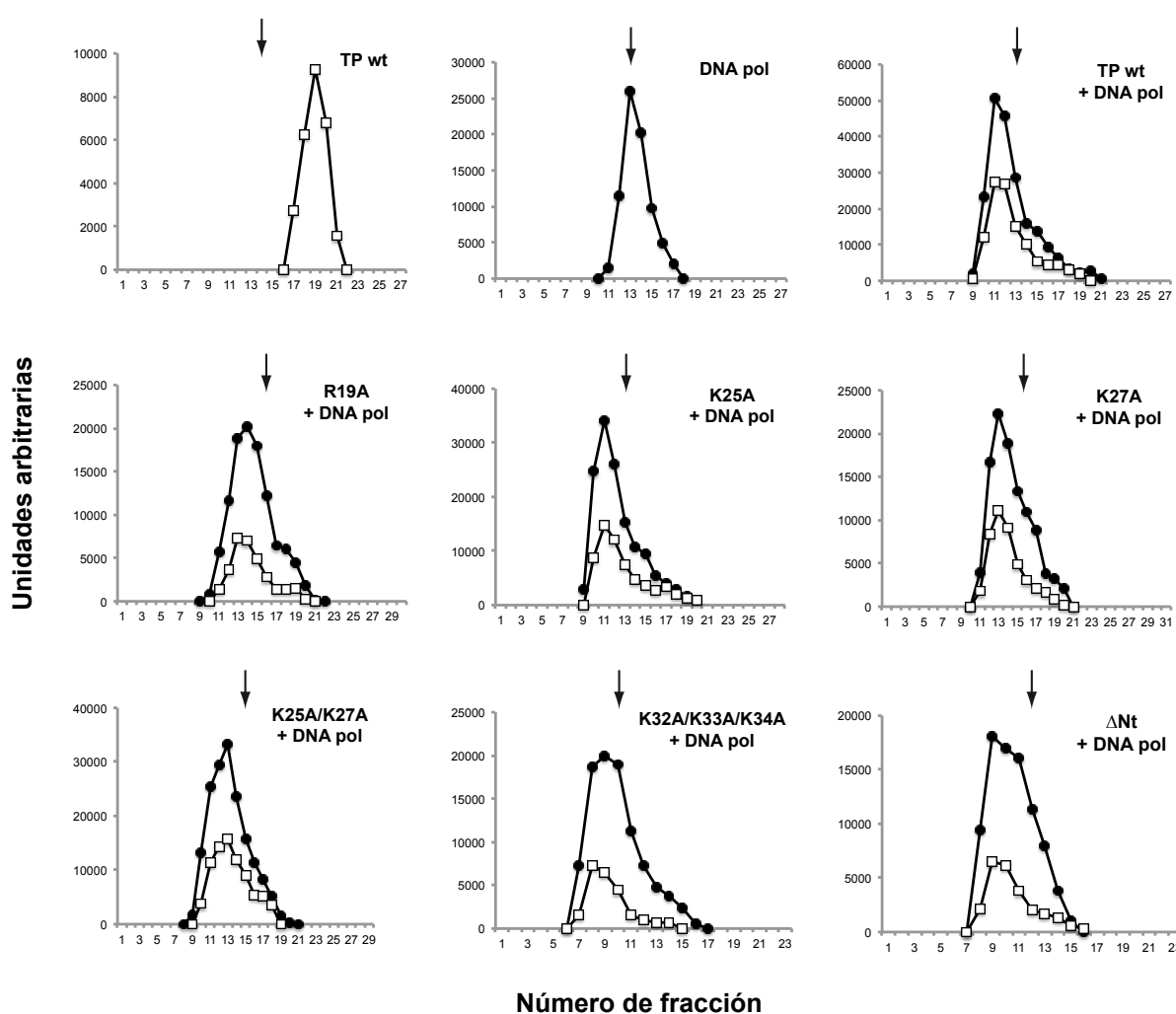
<sup>b</sup>Los números indican el porcentaje medio de actividad de las TP's mutantes relativo a la TP wt y la desviación estándar, obtenidos de tres experimentos independientes, a los 10 min de incubación.

% indica el porcentaje medio de actividad de las TP's mutantes relativo a la TP wt y la desviación estándar, obtenidos de tres experimentos independientes, a los 60 min de incubación.

FA indica el factor de amplificación medio utilizando las TP's mutantes relativo a la TP wt y la desviación estándar, obtenidos de tres experimentos independientes, a los 60 min de incubación.

### 3.2. El dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ es necesario para una correcta interacción con la DNA polimerasa viral

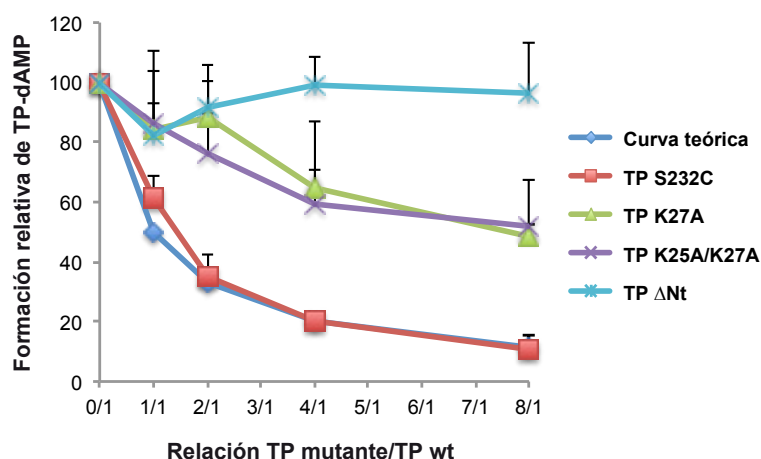
En la reacción de deoxinucleotidilación de la TP en ausencia de molde las únicas interacciones que se requieren son las que tienen lugar entre la DNA polimerasa y el nucleótido iniciador y entre la DNA polimerasa y la TP. El análisis de la interacción entre la DNA polimerasa y las diferentes TPs mediante ultracentrifugación en gradiente de glicerol (**Figura 36**) muestra que, al igual que ocurre con la TP *wild-type*, las TPs mutantes cosedimentan en la misma fracción que la DNA polimerasa, indicando que, en estas condiciones, todas las TPs mutantes forman un complejo estable con la DNA polimerasa.



**Figura 36. Ensayo de interacción TP/DNA polimerasa mediante ultracentrifugación en gradiente de glicerol.** El ensayo se llevó a cabo preincubando 448 nM de TP wt o mutante con 448 nM de DNA polimerasa durante 30 min a 4 °C. La muestra se cargó posteriormente en la parte superior de un gradiente continuo de glicerol del 15 al 30% (4 mL) en presencia de 180 mM NaCl. Los gradientes se centrifugaron y procesaron como se describe en Materiales y Métodos. En las gráficas se representa la cuantificación densitométrica, expresada en unidades arbitrarias, de la DNA polimerasa (círculos negros) y la TP wt o mutante (cuadrados blancos). Las fracciones están numeradas desde la parte inferior a la parte superior del gradiente. La flecha indica el pico de masa de la BSA.

## Resultados

Para determinar si la formación deficiente del complejo TP  $\Delta$ Nt-dAMP con respecto a la TP *wild-type* en ausencia de molde era debida a una interacción menos eficiente con la DNA polimerasa, se llevaron a cabo ensayos de interferencia en ausencia de molde, en los que la interacción de la TP *wild-type* con la DNA polimerasa es competida añadiendo cantidades crecientes de la TP mutante. Como control de interferencia se utilizó una TP mutante en el residuo iniciador (S232C) que es prácticamente inactiva, pero que interacciona con la DNA polimerasa de manera *wild-type* (Garmendia *et al.*, 1990). Como puede observarse en la **Figura 37**, el patrón de competición mostrado por la TP S232C es muy similar al patrón teórico (que supone que la TP competidora interacciona con la DNA polimerasa con la misma afinidad que la TP *wild-type*). Las TPs mutantes K27A y K25A/K27A compiten con la TP *wild-type* por la unión a la DNA polimerasa, aunque necesitan cantidades mayores de proteína que la TP mutante S232C. Sin embargo, la TP mutante  $\Delta$ Nt no interfiere con la TP *wild-type* por la unión a la DNA polimerasa aún estando presente en un exceso de 8 veces sobre la TP *wild-type*, lo que indica que la interacción de esta TP mutante con la DNA polimerasa es mucho menos eficiente que la de la TP *wild-type*.

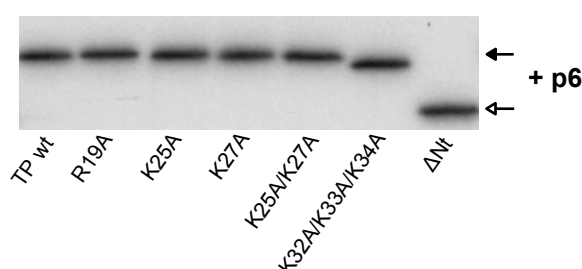


**Figura 37. Ensayo de competición entre la TP wt y las TPs mutantes por la unión a la DNA polimerasa.** El ensayo se llevó a cabo como se ha descrito para la formación del complejo TP-dAMP en ausencia de molde, pero añadiendo cantidades crecientes de la TP mutante en cada caso a una cantidad fija (24 nM) de TP wt o TP S232C. En la gráfica se representan los valores de formación del complejo TP-dAMP relativos a los valores en ausencia de competición (100%). La curva teórica presenta la curva de competición que se obtendría con una TP que se uniese a la DNA polimerasa de la misma manera que la TP *wild-type*. La TP mutante S232C (Garmendia *et al.*, 1990) se llevó como control interno del ensayo. Los complejos TP-dAMP formados se cuantificaron por densitometría y los valores obtenidos compitiendo la TP S232C con cada TP mutante se sustrajeron a los valores obtenidos compitiendo la TP wt con cada una de las TPs mutantes. Los datos representan la media y la desviación estándar, obtenidos a partir de tres experimentos independientes.



### 3.3. La proteína p6 compensa el defecto de iniciación de los mutantes de la TP de $\phi 29$ afectados en unión a DNA

Trabajos anteriores determinaron que la proteína viral de unión a DNA de doble cadena, p6, estimula la formación del complejo de iniciación disminuyendo la  $K_m$  de la DNA polimerasa por el nucleótido iniciador (Blanco *et al.*, 1986), así como la transición de la iniciación cebada con proteína terminal a la elongación con DNA (Blanco *et al.*, 1988). La proteína p6 se une a los orígenes de replicación, produciendo un cambio conformacional que se ha propuesto que ayudaría a abrir la doble hélice de DNA (Prieto *et al.*, 1988; Serrano, 1990; Serrano *et al.*, 1994). Por otra parte, Pérez-Arnaiz y colaboradores determinaron que el dominio N-terminal de la TP era dispensable para la reacción de iniciación en presencia de la proteína p6 (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2007). Para determinar el efecto de la proteína p6 en reacciones de iniciación de la replicación del TP-DNA de  $\phi 29$  utilizando las TPs mutantes en el dominio N-terminal como cebadoras, se llevaron a cabo experimentos de iniciación en las mismas condiciones que los descritos en el apartado 3.1. (**Figura 34**) pero en presencia de la proteína p6. Como puede observarse en la **Figura 38** y en la **Tabla I**, en presencia de p6 todas las TPs mutantes presentan niveles de iniciación similares a los de la TP *wild-type*.

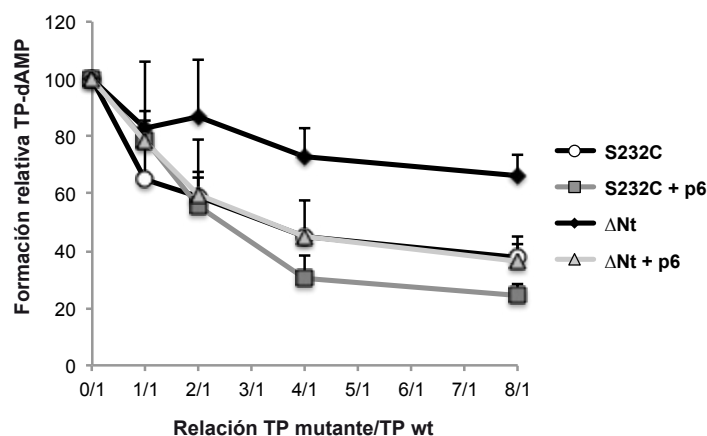


**Figura 38. Formación del complejo TP-dAMP *in vitro* en presencia de TP-DNA, utilizando la TP wt o las TPs mutantes como iniciadores en presencia de la proteína p6.** El ensayo se realizó en las mismas condiciones que las descritas en el ensayo de formación del complejo TP-dAMP en presencia de TP-DNA, pero añadiendo 35  $\mu$ M de proteína p6. La flecha negra indica la posición del complejo TP-dAMP y la flecha blanca la posición del complejo TP  $\Delta$ Nt-dAMP. La figura es representativa de tres experimentos independientes.

Dado que la unión del mutante de delección TP  $\Delta$ Nt a la DNA polimerasa es menos eficiente que la de la TP *wild-type* pero presenta niveles de iniciación similares a ésta en presencia de la proteína p6, analizamos la capacidad de esta TP mutante de competir con la TP *wild-type* por la unión a la DNA polimerasa en presencia de p6. Para ello se llevaron a cabo experimentos de interferencia utilizando TP-DNA como molde, tanto en ausencia como en presencia de la proteína p6. La **Figura 39** muestra que en ausencia de la proteína p6 el mutante TP  $\Delta$ Nt sólo interfiere ligeramente con la TP *wild-type* por la unión a la DNA polimerasa. Por el contrario, en presencia de la proteína p6, el patrón de competición de esta TP mutante es muy similar al de la TP mutante S232C (tanto en ausencia como en presencia de p6),

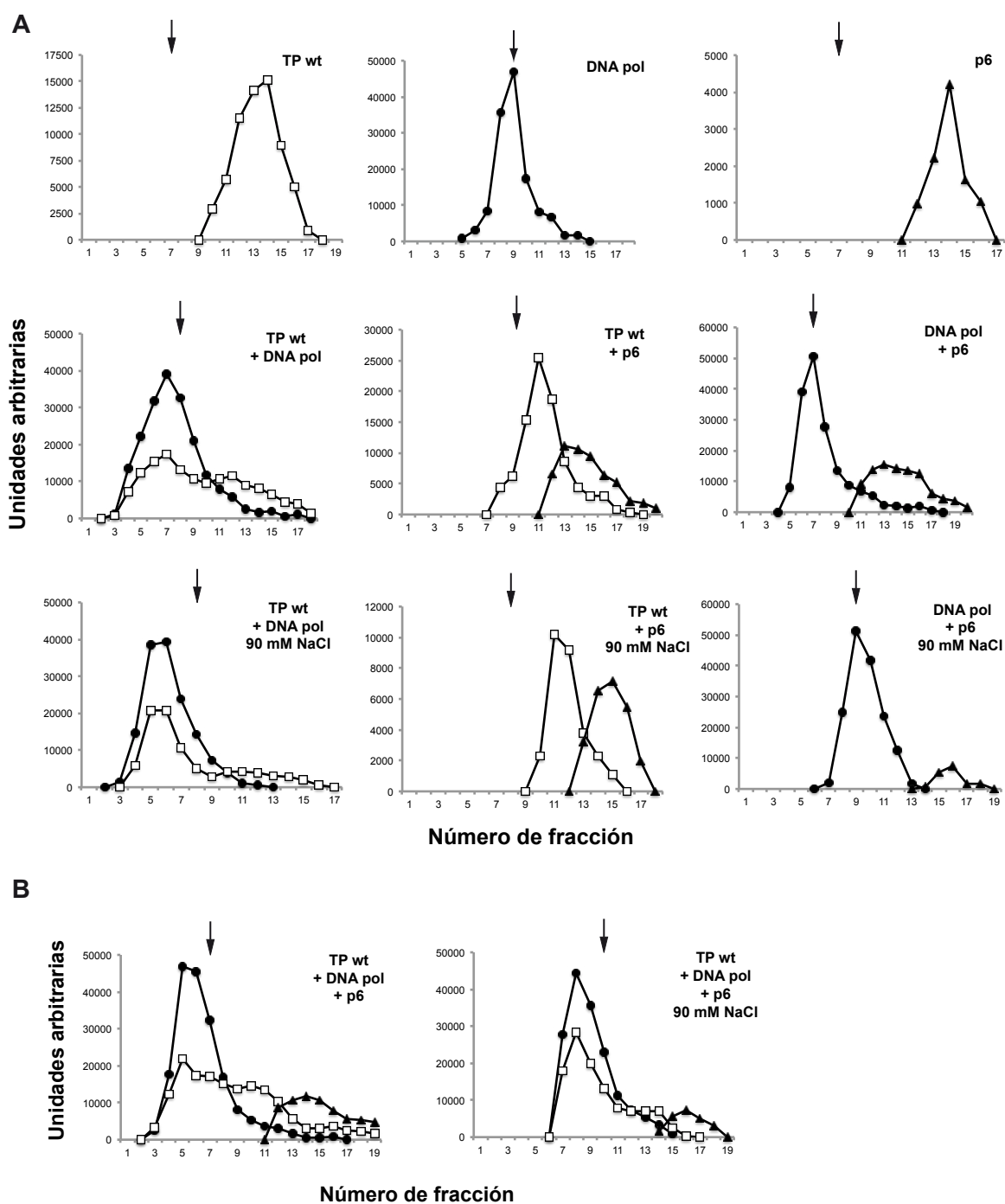
## Resultados

indicando que en estas condiciones la unión de la TP mutante  $\Delta Nt$  a la DNA polimerasa alcanza niveles similares a los de la TP *wild-type*.



**Figura 39. Ensayo de competición entre la TP wt y la TP  $\Delta Nt$  por la unión a la DNA polimerasa, en ausencia o en presencia de la proteína p6.** El ensayo se realizó como se ha descrito para la formación del complejo TP-dAMP en presencia de TP-DNA, pero añadiendo cantidades crecientes de TP  $\Delta Nt$  a una cantidad fija de TP wt. El ensayo se realizó tanto en ausencia como en presencia de 35  $\mu M$  de proteína p6. En la gráfica se representan los valores de formación del complejo TP-dAMP relativos a los valores en ausencia de competición (100%). La TP mutante S232C se llevó como control interno del ensayo tanto en ausencia como en presencia de 35  $\mu M$  de proteína p6. Los complejos TP-dAMP formados se cuantificaron por densitometría. Los datos representan la media y la desviación estándar, obtenidos a partir de tres experimentos independientes.

Se ha descrito que la proteína p6 requiere un posicionamiento específico con respecto a los extremos del DNA viral para activar la reacción de iniciación (Serrano *et al.*, 1990). Por ello, se ha sugerido que la proteína p6 podría inducir un cambio conformacional en el DNA, que sería reconocido por la TP y/o la DNA polimerasa (Serrano *et al.*, 1994), y/o podría interaccionar con alguna de estas proteínas en los orígenes de replicación (Serrano *et al.*, 1994). Asimismo, el análisis de la capacidad de activación de la iniciación por parte de la p6 de los fagos  $\phi 29$ , Nf y GA1 mostró que para que se dé una activación óptima es necesaria la formación del complejo nucleoproteico homólogo en los orígenes de replicación, es decir, que la p6 y el TP-DNA sean del mismo fago, y además que este complejo sea reconocido por el heterodímero homólogo (Freire *et al.*, 1996). Así, para analizar una posible interacción de la proteína p6 con la TP y/o la DNA polimerasa, se llevaron a cabo experimentos de ultracentrifugación en gradiente de glicerol (**Figura 40A**). Ninguna de las dos proteínas formó un complejo estable con la p6 en las condiciones analizadas (en presencia de 90 o 180 mM NaCl). Por otra parte, para analizar si para que la interacción tuviera lugar era necesaria la formación del heterodímero TP/DNA polimerasa, se llevó a cabo el mismo experimento pero incubando las tres proteínas simultáneamente. La **Figura 40B** muestra que, en estas condiciones, la DNA polimerasa y la TP cosedimentan en las mismas fracciones, mientras que la p6 sedimenta de manera independiente en fracciones de menor peso molecular.



**Figura 40. Ensayo de interacción de la proteína p6 con la TP y/o la DNA polimerasa mediante ultracentrifugación en gradiente de glicerol.** (A) El ensayo se llevó a cabo preincubando 713 nM de p6 con 713 nM de TP o 713 nM de DNA polimerasa durante 30 min a 4 °C. La muestra se cargó en la parte superior de un gradiente continuo de glicerol del 15 al 30% (4 mL) en presencia de 180 mM NaCl, o 90 mM NaCl cuando se indica. Los gradientes se centrifugaron y procesaron como se describe en Materiales y Métodos. (B) El ensayo se llevó a cabo preincubando 713 nM de p6 con 713 nM de TP y 713 nM DNA polimerasa durante 30 min a 4 °C y las muestras se procesaron como se describe en (A). En las gráficas se representa la cuantificación densitométrica, expresada en unidades arbitrarias, de la DNA polimerasa (círculos negros), la TP wt (cuadrados blancos) y la p6 (triángulos negros). Las fracciones están numeradas desde la parte inferior a la parte superior del gradiente. La flecha indica el pico de masa de la BSA.

### 3.4. La utilización de las TPs mutantes K27A y K25A/K27A como cebadores aumenta la $K_m$ de la DNA polimerasa por el nucleótido iniciador. En presencia de la proteína p6, la $K_m$ de la DNA polimerasa por el nucleótido iniciador es similar utilizando tanto la TP *wild-type* como las TPs mutantes como cebadores

Como se ha mostrado anteriormente, las TPs mutantes en el dominio N-terminal K27A y K25A/K27A afectadas en la reacción de iniciación utilizando TP-DNA como molde presentan eficiencias de iniciación *wild-type* en presencia de la proteína p6. Puesto que la proteína p6 disminuye la  $K_m$  de la DNA polimerasa por el nucleótido iniciador (Blanco *et al.*, 1986), determinamos si la utilización de estas TPs mutantes como cebadores afectaba la afinidad de la DNA polimerasa por dATP. Para ello, determinamos la  $K_m$  por dATP de la DNA polimerasa en la reacción de iniciación utilizando TP-DNA como molde y cada una de estas TPs como cebadores, tanto en ausencia como en presencia de p6 (ver Materiales y Métodos). Como se muestra en la **Tabla II**, la  $K_m$  de la DNA polimerasa en presencia de la TP *wild-type* es de 43,5  $\mu$ M. De manera similar, utilizando la TP mutante K25A como cebador, la  $K_m$  de la DNA polimerasa por dATP es 33,4  $\mu$ M. Sin embargo, la  $K_m$  de la DNA polimerasa en presencia de las TPs mutantes K27A y K25A/K27A, es de aproximadamente 8 y 12 veces mayor, respectivamente, que en presencia de la TP *wild-type*. En presencia de la proteína p6, la  $K_m$  de la DNA polimerasa utilizando la TP *wild-type* o la TP K25A como cebadores disminuyó alrededor de 9 y 8 veces, respectivamente, con respecto a la  $K_m$  en ausencia de proteína p6. En el caso de las TPs mutantes K27A y K25A/K27A en presencia de p6, la  $K_m$  de la DNA polimerasa disminuyó aproximadamente 130 y 190 veces, respectivamente, obteniéndose unos valores de  $K_m$  incluso menores a los obtenidos con la TP *wild-type*.

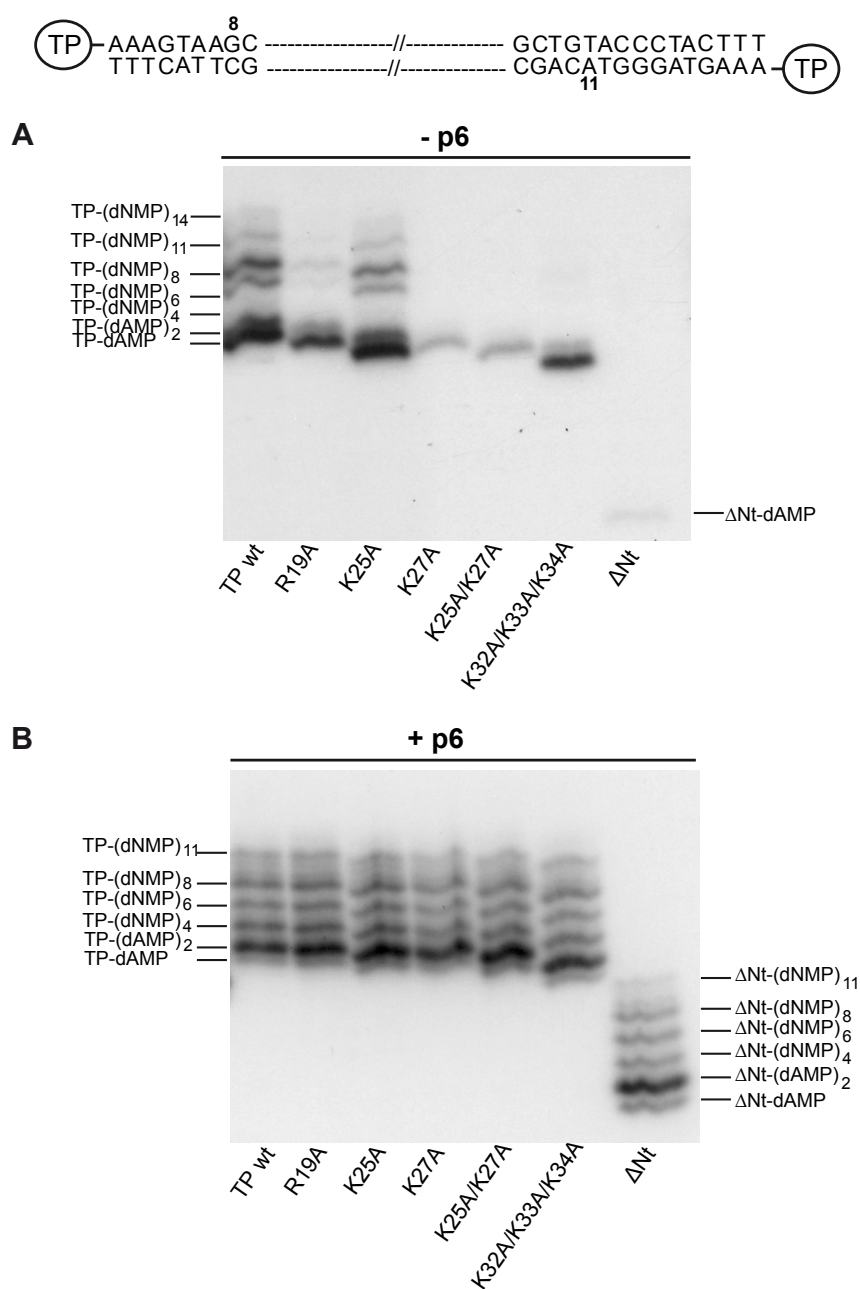
**Tabla II. Afinidad de la DNA polimerasa por dATP en ausencia o en presencia de la proteína p6.**

TP	$K_m^a$ ( $\mu$ M)	
	- p6	+ p6
TP wt	43,5 $\pm$ 5,5	4,6 $\pm$ 1,5
K25A	33,4 $\pm$ 4	4,4 $\pm$ 0,7
K27A	354,4 $\pm$ 75	2,7 $\pm$ 1,4
K25A/K27A	512,3 $\pm$ 40	2,7 $\pm$ 0,1

<sup>a</sup> $K_m$  de la DNA polimerasa por dATP (media y desviación estándar) en reacciones de iniciación en presencia de TP-DNA utilizando la TP indicada como iniciador, en ausencia o en presencia de la proteína p6. Los valores se obtuvieron a partir de cuatro experimentos independientes.

### 3.5. Los mutantes de la TP de $\phi 29$ afectados en unión a DNA están afectados en la etapa de transición de la iniciación con proteína terminal a la elongación con DNA

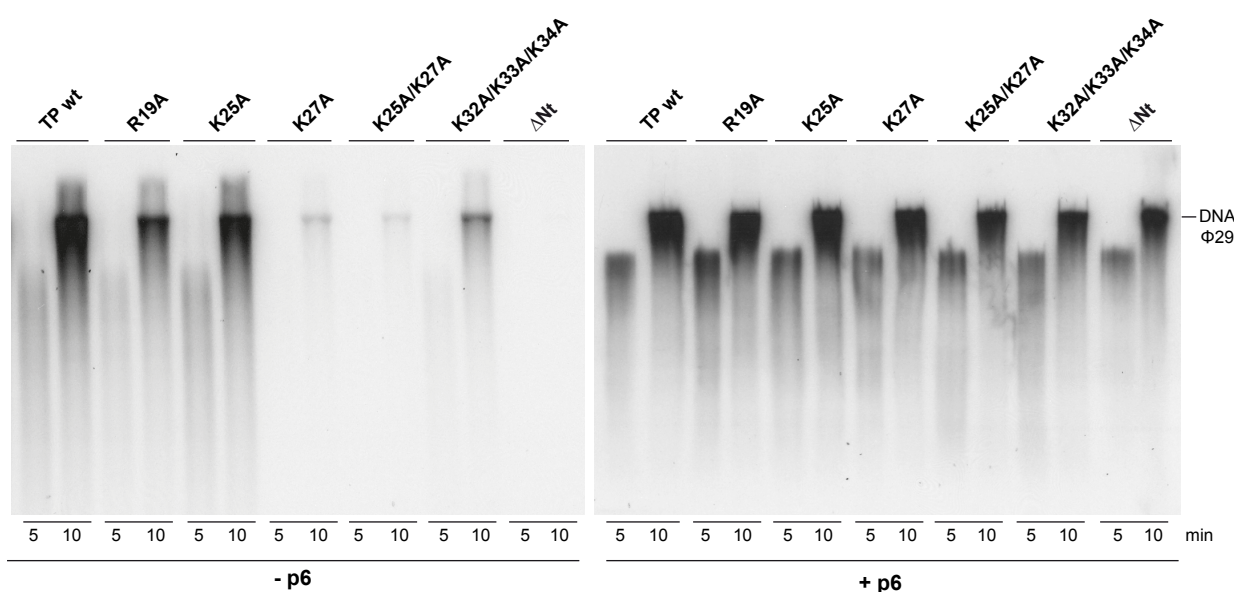
Tras la reacción de iniciación, la DNA polimerasa incorpora cuatro nucleótidos adicionales mientras permanece asociada a la TP, experimenta algunos cambios conformacionales durante la incorporación de los nucleótidos 6 a 9 y se disocia finalmente de la TP cuando el décimo nucleótido es insertado (Méndez *et al.*, 1997; Kamtekar *et al.*, 2006). Entonces, la DNA polimerasa continúa con la elongación del DNA de manera procesiva, acoplada a desplazamiento de banda, hasta la completa duplicación del DNA molde (Blanco *et al.*, 1989). La etapa comprendida entre la iniciación cebada con TP y la disociación de la DNA polimerasa para continuar con la elongación se conoce como transición. Para analizar los productos de reacción generados durante esta etapa, se realizaron ensayos de transición en presencia de tres de los cuatro dNTPs (en ausencia de dCTP) y se analizaron los productos generados en geles de poliacrilamida de alta resolución (ver Materiales y Métodos). Para detectar los productos abortivos generados, se utilizó la DNA polimerasa mutante N62D, que tiene muy reducida la actividad exonucleolítica 3'-5', pero que mantiene la capacidad de desplazamiento de banda (de Vega *et al.*, 1996). La **Figura 41A** muestra que cuando la DNA polimerasa utiliza la TP *wild-type* como cebador, se generan los productos de iniciación TP-(dAMP)<sub>1-2</sub>, y los productos TP(dNMP)<sub>8-11</sub> que resultan de la elongación truncada iniciada desde ambos orígenes de replicación. Además, se generan los productos TP(dNMP)<sub>4-6</sub>, que probablemente corresponden a productos abortivos generados durante la transición entre la iniciación y la elongación, y el producto TP(dNMP)<sub>14</sub>, este último resultado, probablemente, de una incorporación errónea en la posición +12, iniciada desde el origen de replicación derecho y posteriormente elongada, como se había descrito anteriormente que ocurría utilizando la polimerasa mutante N62D (Dufour *et al.*, 2003). La TP mutante K25A presenta un patrón de bandas similar al de la TP *wild-type*, generando los mismos productos en cantidad similar a ésta. En el caso de la TP mutante R19A, el patrón es similar, pero hay una menor generación de cada uno de los productos, como se puede observar por la menor intensidad de las bandas. El mutante K32A/K33A/K34A presenta una menor eficiencia de iniciación, por lo que sólo se observan los productos TP-(dAMP)<sub>1-2</sub> y una banda muy débil en la posición +8. Por otro lado, en presencia de las TPs mutantes K27A, K25A/K27A y  $\Delta Nt$  se incorpora sólo el primer dAMP, siendo la generación de este producto mucho menor en el caso del mutante de delección  $\Delta Nt$ . Sin embargo, en presencia de la proteína p6 el patrón y la cantidad de los productos de transición generados es similar entre las TPs mutantes y la TP *wild-type* (**Figura 41B**). Cabe destacar que en presencia de p6 la banda más intensa corresponde al producto TP-dAMP<sub>2</sub> utilizando cualquiera de las TPs como cebadores, lo que indicaría que la proteína p6 está facilitando la incorporación del segundo nucleótido, bien mediante el favorecimiento del *sliding-back* o bien mediante una incorporación más eficiente del segundo nucleótido tras la translocación.



**Figura 41. Análisis de los productos de transición generados durante la replicación del TP-DNA de  $\phi 29$ , en ausencia o en presencia de la proteína p6. (A y B)** El ensayo se realizó utilizando 12 nM de TP wt o TP mutante, 12 nM de la DNA polimerasa mutante N62D (de Vega *et al.*, 1996), 1,6 nM de TP-DNA como molde y 10 mM  $MgCl_2$  en presencia de 5  $\mu M$  dATP, dTTP y dGTP. Las muestras se incubaron a 30 °C durante 5 min en ausencia (A) o en presencia (B) de 35  $\mu M$  de proteína p6. Las muestras se procesaron como se indica en Materiales y Métodos y se analizaron en geles de poliácridamida al 12% de alta resolución. En la figura se indica la posición de los productos TP-dAMP, TP-(dAMP)<sub>2</sub>, TP-(dNMP)<sub>4</sub>, TP-(dNMP)<sub>6</sub>, TP-(dNMP)<sub>8</sub>, TP-(dNMP)<sub>11</sub> y TP-(dNMP)<sub>14</sub>. La figura es representativa de tres experimentos independientes. En la parte superior de la figura se muestra una representación esquemática de los dos orígenes de replicación del TP-DNA de  $\phi 29$ , donde se indican con número los últimos productos que se esperarían a partir de reacciones de iniciación en ambos orígenes de replicación en las condiciones ensayadas.

### 3.6. Replicación del TP-DNA de $\phi 29$ *in vitro* utilizando las TPs mutantes en el dominio N-terminal como cebadores

La replicación del TP-DNA de  $\phi 29$  implica la iniciación cebada con TP en ambos orígenes de replicación y la elongación posterior por la DNA polimerasa, sin la necesidad de otras proteínas adicionales debido a la alta procesividad de esta enzima y a su capacidad de desplazamiento de banda (Blanco *et al.*, 1989). Así, se ha desarrollado un sistema mínimo de replicación del TP-DNA de  $\phi 29$  *in vitro* en el que las únicas proteínas necesarias para llevar a cabo la duplicación completa del genoma viral son la TP y la DNA polimerasa (Blanco *et al.*, 1989). En estas condiciones, analizamos la eficiencia de las TPs mutantes para llevar a cabo la replicación del TP-DNA de  $\phi 29$ . En concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de iniciación y de transición, cuando la TP K25A es usada como cebador, la eficiencia de la replicación es similar a la de la TP *wild-type* (Figura 42 y Tabla I). Utilizando la TP R19A como cebador, la eficiencia de replicación relativa a la de la TP *wild-type* es del 44%. Cuando se utiliza la TP mutante K32A/K33A/K34A la replicación está bastante afectada, siendo la eficiencia con respecto a la TP *wild-type* del 16%. En el caso de las TPs mutantes K27A, K25A/K27A y  $\Delta Nt$ , la eficiencia de la replicación disminuye drásticamente, siendo del 3, 3 y 1%, respectivamente.



**Figura 42. Replicación del TP-DNA de  $\phi 29$  *in vitro*, en ausencia o en presencia de la proteína p6.** El ensayo se realizó utilizando 12 nM de TP wt o TP mutante, 12 nM de DNA polimerasa, 1,6 nM de TP-DNA como molde, 20  $\mu$ M dNTPs y 10 mM  $MgCl_2$ , en ausencia o en presencia de 35  $\mu$ M p6. Las muestras se incubaron a 30 °C durante los tiempos indicados y se procesaron y analizaron como se describe en Materiales y Métodos. En la figura se indica la posición correspondiente al tamaño completo del DNA de  $\phi 29$ . La figura es representativa de tres experimentos independientes.

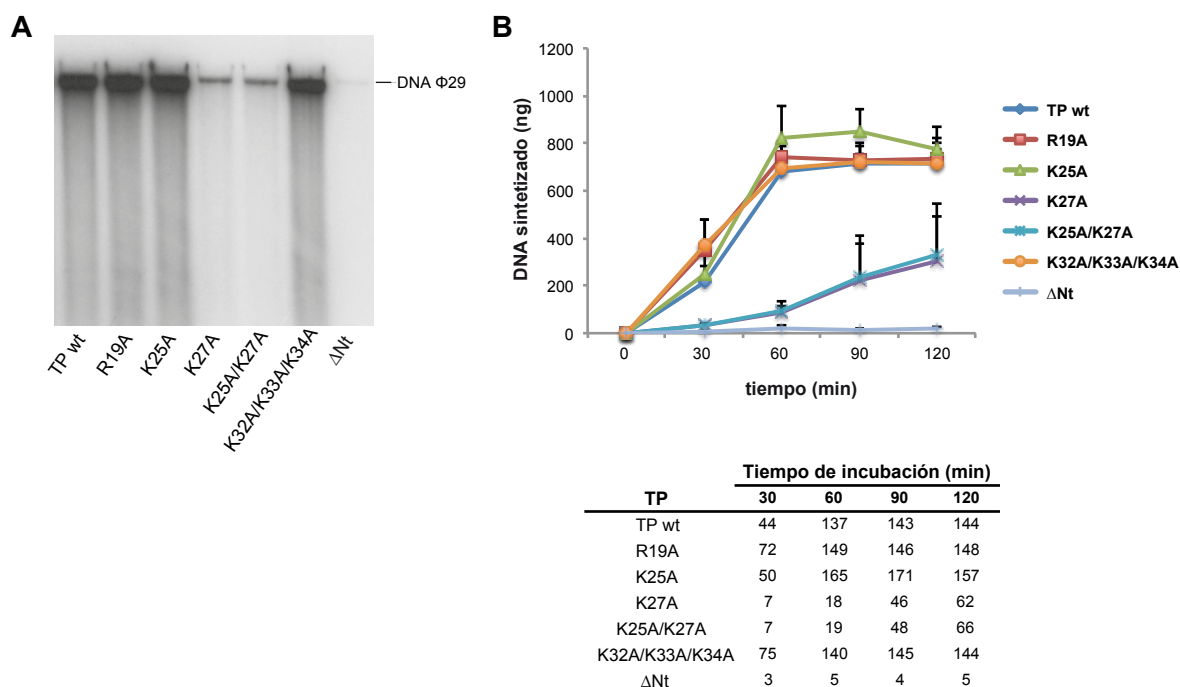


Por tanto, excepto en el caso del mutante K25A, el resto de las TPs mutantes están afectadas en la etapa de replicación en mayor grado que en etapas anteriores. Esto podría ser debido a efectos acumulativos derivados de unas etapas de iniciación y transición deficientes. Asimismo, al igual que ocurría en las etapas anteriores, en presencia de la proteína p6 la eficiencia de replicación utilizando las TPs mutantes como cebadoras alcanza niveles similares a los de la TP *wild-type* (**Figura 42** y **Tabla I**). En el caso del mutante de delección  $\Delta Nt$  en presencia de la proteína p6 presenta una eficiencia de replicación del 60% con respecto a la TP *wild-type*.

### 3.7. El dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ es necesario para la amplificación del TP-DNA viral *in vitro*

Una vez completada una ronda de duplicación del DNA viral, la polimerasa se disocia de los extremos del genoma para comenzar otra ronda de replicación. Cantidades muy reducidas de TP-DNA de partida (0,5 ng) pueden ser amplificadas hasta 1000 veces en presencia de dos proteínas adicionales, la proteína de unión a DNA de banda simple p5 y la proteína p6 (Blanco *et al.*, 1994). En estas condiciones, analizamos la eficiencia de amplificación utilizando las TPs mutantes en el dominio N-terminal como cebadores. Como puede observarse en la **Figura 43A**, a los 60 min post-incubación, tiempo en el que la reacción con la TP *wild-type* alcanza la saturación, las TPs mutantes R19A, K25A y K32A/K33A/K34A presentan eficiencias de amplificación similares a las de la TP *wild-type*. Por el contrario, las TPs mutantes K27A y K25A/K27A presentan valores de amplificación del 12% y 13% de la TP *wild-type*, respectivamente, a los 60 min post-incubación (**Tabla I**). El mutante  $\Delta Nt$  es el más afectado, presentando valores del 3% con respecto a la TP *wild-type*. Por otro lado, en la **Figura 43B** se muestra la cinética de síntesis de DNA (en ng) y el factor de amplificación (FA) a los distintos tiempos de incubación con cada TP. El FA se define como el *ratio* entre los ng de DNA presentes al final de la reacción, esto es, el DNA inicial más el DNA sintetizado, y los ng de DNA inicial. Utilizando la TP *wild-type* como cebador, el FA alcanzado a los 60 min de incubación es de 137, similar al obtenido utilizando las TPs R19A y K32A/K33A/K34A (149 y 140, respectivamente). En el caso de la TP K25A se obtiene un FA ligeramente superior al de la TP *wild-type*, de alrededor de 165. Por el contrario, el FA alcanzado utilizando las TPs mutantes K27A y K25A/K27A es de 18 y 19, respectivamente. Cabe destacar que a tiempos mayores de incubación (120 min) en presencia de estas TPs mutantes se continúa sintetizando DNA, alcanzándose factores de amplificación de 62 y 66, respectivamente. Por el contrario, las reacciones de amplificación con el mutante de delección TP  $\Delta Nt$ , alcanzan un FA máximo de 5 a los 60 min, valor que no se incrementa con el tiempo de incubación.



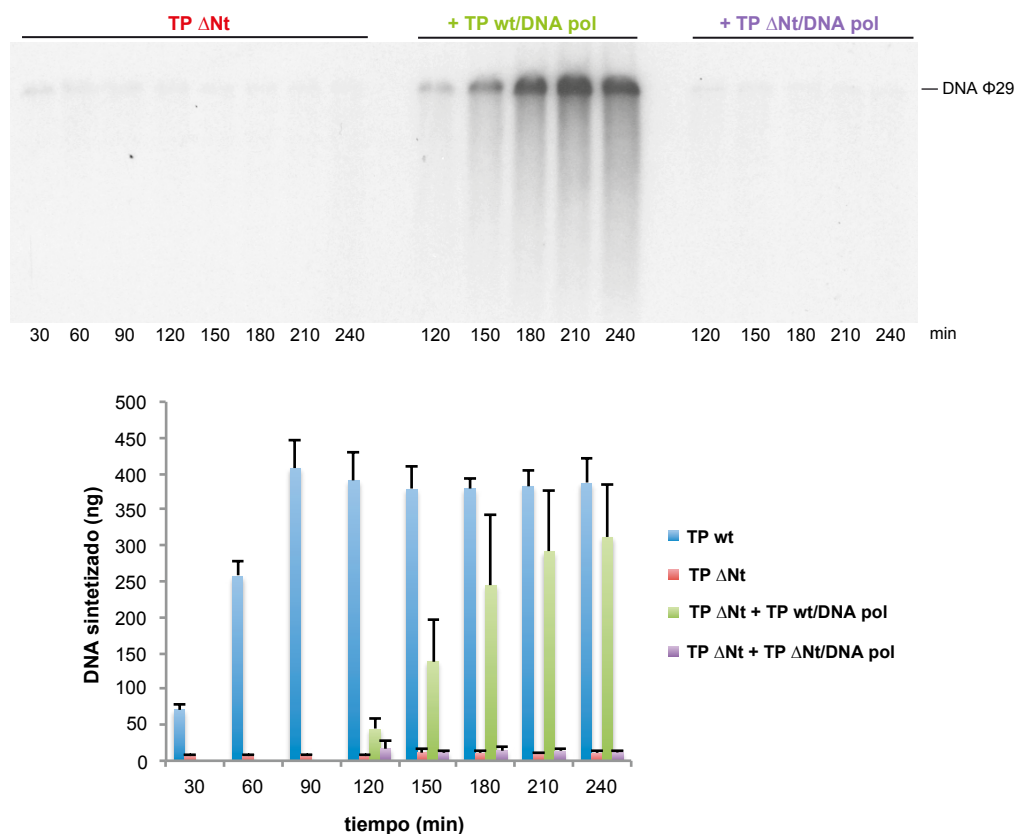


**Figura 43. Amplificación del TP-DNA de  $\phi 29$  *in vitro*.** El ensayo se realizó utilizando 6 nM de TP wt o mutante, 6 nM de DNA polimerasa, 16 pM de TP-DNA como molde, 35  $\mu$ M p6, 30  $\mu$ M p5 y 10 mM  $MgCl_2$  en presencia de 80  $\mu$ M dNTPs. **(A)** Reacciones de amplificación a los 60 min de incubación a 30 °C utilizando la TP wt o el mutante indicado como iniciador. Se indica la posición correspondiente al tamaño completo del DNA de  $\phi 29$ . **(B)** La gráfica muestra la cinética del DNA sintetizado (en ng) a los distintos tiempos de incubación indicados. Los datos presentan los valores medios y la desviación estándar, obtenidos a partir de tres experimentos independientes. En la tabla los números muestran el FA calculado como la relación entre la cantidad de DNA (en ng) al final de la reacción (DNA inicial + DNA sintetizado) y el DNA inicial.

Durante la amplificación, la TP actúa en primer lugar como cebador de la reacción de iniciación, tras la cual queda covalentemente unida a los extremos 5' del DNA viral. Así, en la siguiente ronda de replicación esta TP actuará como TP parental. Los resultados obtenidos en las reacciones de amplificación utilizando la TP mutante  $\Delta Nt$  como iniciadora (**Figura 43** y **Tabla I**) sugieren que sólo se produce una ronda de replicación, impidiendo la incorporación adicional de dNMPs en el caso de los orígenes que contienen la TP  $\Delta Nt$  como parental, debido probablemente a un bloqueo del origen de replicación cuando esta TP mutante actúa como TP parental y como TP iniciadora simultáneamente. Así, si este fuera el caso, la adición de heterodímero DNA polimerasa/TP *wild-type* a estas reacciones debería dar lugar a un “desbloqueo” del origen de replicación, produciéndose incorporación adicional de dNMPs. Para analizar esta hipótesis, se llevaron a cabo reacciones de amplificación utilizando la TP  $\Delta Nt$  hasta los 90 min post-incubación, tras los cuales se dividió la muestra inicial en tres muestras diferentes: a una de ellas se añadió heterodímero *wild-type* (TP *wild-type*/DNA polimerasa), a otra se añadió heterodímero mutante (TP  $\Delta Nt$ /DNA polimerasa) y a otra se añadió tampón de dilución de las proteínas, y se continuó con la incubación de las tres muestras durante 150 min adicionales. La **Figura 44** muestra que sólo se produce síntesis adicional de DNA en el caso de la adición del heterodímero *wild-type*. Esto indica que la TP mutante  $\Delta Nt$  sólo puede ser funcional como TP parental cuando la TP *wild-type* actúa

## Resultados

como TP iniciadora, y que la presencia de la TP mutante  $\Delta Nt$  tanto como TP iniciadora como TP parental inactiva los orígenes de replicación. Este bloqueo de los orígenes de replicación podría ser debido a una interacción deficiente entre la TP iniciadora y la TP parental. Por tanto, estos resultados indican que el dominio N-terminal es importante para una amplificación eficiente del TP-DNA de  $\phi 29$  *in vitro*. Por otro lado, puesto que las reacciones de amplificación son menos eficientes utilizando los mutantes K27A y K25A/K27A, estas TPs podrían estar moderadamente afectadas en su función como TP parentales.



TP	Tiempo de incubación (min)							
	30	60	90	120	150	180	210	240
TP wt	15	52	83	79	77	77	77	78
TP $\Delta Nt$	2	3	3	3	3	3	3	3
TP $\Delta Nt$ + TP wt/DNA pol				10	29	50	59	63
TP $\Delta Nt$ + TP $\Delta Nt$ /DNA pol				4	3	4	4	3

**Figura 44. Amplificación del TP-DNA de  $\phi 29$  recebando con heterodímero *wild-type* o heterodímero mutante a los 90 min de incubación.** El ensayo se realizó utilizando 6 nM de TP wt o TP  $\Delta Nt$ , 6 nM de DNA polimerasa, 16 pM de TP-DNA, 35  $\mu M$  de p6, 30  $\mu M$  de p5, 80  $\mu M$  dNTPs y 10 mM  $MgCl_2$ . Las muestras se incubaron a 30 °C durante los tiempos indicados y se procesaron y analizaron como se describe en Materiales y Métodos. El panel superior muestra las reacciones de amplificación utilizando la TP mutante  $\Delta Nt$  a los tiempos indicados de incubación y las reacciones de amplificación tras la adición a los 90 min de incubación de heterodímero *wild-type* (TP wt/DNA pol) o heterodímero mutante (TP  $\Delta Nt$ /DNA pol). Se indica la posición correspondiente al tamaño completo del DNA de  $\phi 29$ . La figura es representativa de tres experimentos independientes. El gráfico de barras muestra la cinética de síntesis de DNA (en ng) para las condiciones mencionadas anteriormente a los tiempos de incubación indicados. Como control, se muestran las reacciones de amplificación utilizando la TP wt. Los datos se presentan como los valores medios y la desviación estándar, obtenidos a partir de tres experimentos independientes. La tabla muestra el FA obtenido en las condiciones mencionadas anteriormente a los distintos tiempos de incubación.

## Discusión

---



## 1. Papel del dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ en la replicación del DNA viral *in vivo*

A diferencia de los organismos vivos, los virus son metabólicamente inertes fuera de la célula, dependiendo del ambiente de una célula hospedadora para poder llevar a cabo su replicación. Por este motivo, los virus hacen uso de estructuras y componentes celulares que permitan una replicación eficiente de su material genético y el posterior ensamblaje de éste en partículas virales infectivas. Actualmente, el conocimiento que se tiene sobre el desarrollo del ciclo infectivo de bacteriófagos dentro de la bacteria es muy limitado.

En la presente Tesis hemos profundizado en el estudio de la replicación del bacteriófago  $\phi 29$  *in vivo* mediante la localización de proteínas de la maquinaria replicativa viral en la bacteria infectada. Los resultados obtenidos nos han permitido dilucidar la organización de la replicación de  $\phi 29$  durante el ciclo infectivo. De esta manera, hemos determinado que tanto la TP fusionada a YFP (equivalente a la TP iniciadora) como la TP parental localizan en el nucleóide bacteriano. La localización de la TP depende de la distribución dinámica que exhiba el nucleóide bacteriano en cada etapa del ciclo celular. Por otra parte, la localización de la TP determina la localización subcelular de la DNA polimerasa viral, probablemente mediante la interacción directa entre ambas proteínas. De esta manera, la DNA polimerasa colocaliza con la TP en el nucleóide bacteriano a lo largo de todo el ciclo infectivo. Es de destacar que, en células infectadas, ambas proteínas siguen un patrón de distribución helicoidal en etapas tardías del ciclo celular. Como se ha mostrado, el patrón helicoidal de la TP depende de la presencia de la proteína del citoesqueleto de actina bacteriano MreB. Estos datos concuerdan con resultados anteriores sobre la pérdida del patrón helicoidal de localización de la DNA polimerasa viral y de la proteína p16.7 durante la infección de estirpes delecionadas en cualquiera de los 3 genes parálogos de MreB: *mreB*, *mbl* y *mreBH* (Muñoz-Espín *et al.*, 2009). Además, se determinó que la proteína p16.7 interacciona de manera directa con MreB (Muñoz-Espín *et al.*, 2009). Aunque la TP de  $\phi 29$  sigue la dinámica de distribución del nucleóide bacteriano, la localización de la TP y la DNA polimerasa viral formando estructuras tipo helicoidal ocurre sólo en células que están infectadas. Por tanto, basándonos en estos resultados y los datos anteriormente citados, proponemos que la distribución de la TP siguiendo un patrón helicoidal sería llevada a cabo mediante su interacción con la proteína p16.7 o mediante la interacción de p16.7 con las bandas de ssDNA del genoma viral (Serna-Rico *et al.*, 2002; 2003), y que la localización de la DNA polimerasa dependería a su vez de la localización de la TP, mediada por una interacción entre ambas proteínas. De acuerdo con esto, la DNA polimerasa viral no presenta un patrón de distribución helicoidal en células que son infectadas con el fago *sus3*(91) (Muñoz-Espín, 2006).

La TP de  $\phi 29$  localiza en el nucleóide de *B. subtilis* en ausencia de otros componentes virales, presentando además esta localización subcelular cuando es expresada en la bacteria no hospedadora *E. coli*. Mediante la expresión de manera independiente de cada uno de los 3 dominios que constituyen

la TP fusionados a YFP, hemos determinado que la localización de la TP en el nucleóide bacteriano depende de su dominio N-terminal. Por otro lado, los ensayos de retraso en gel muestran que este dominio tiene capacidad de unión a DNA de manera inespecífica de secuencia, como se había propuesto en trabajos anteriores (Zaballos and Salas, 1989). Por tanto, en base a estos resultados, planteamos que la localización de la TP en el nucleóide bacteriano podría estar ocurriendo a través de su unión inespecífica al DNA genómico de la bacteria. Para analizar esta hipótesis y determinar los residuos específicos que están involucrados en la unión a DNA y probablemente en la localización en el nucleóide bacteriano, cambiamos todos los residuos básicos del dominio N-terminal de la TP a alanina y analizamos, en primer lugar, la capacidad de estas proteínas fusionadas a YFP de localizar en el nucleóide bacteriano. Los resultados obtenidos muestran que el residuo Lys27 es crucial para la localización de la TP en el nucleóide bacteriano, siendo el único residuo básico del dominio N-terminal que mutado de forma independiente afecta a esta localización. Además, el cambio doble de los residuos Lys25 y Lys27 afecta en mayor grado la localización de la TP en el nucleóide bacteriano que el cambio del residuo Lys27 por alanina. Sin embargo, el cambio del residuo Lys25 de la TP a alanina no tiene ningún efecto observable en cuanto a la localización de la proteína en el nucleóide, presentando un fenotipo de localización *wild-type*. Podría ocurrir que, al ser dos residuos muy próximos, el cambio doble de los residuos Lys25 y Lys27 a alanina provoque una distorsión local de la  $\alpha$ -hélice, lo que explicaría que el defecto de localización observado en el doble mutante K25A/K27A sea mayor que en el caso del mutante K27A.

Para determinar el mínimo fragmento peptídico de la TP capaz de localizar en el nucleóide bacteriano, se construyeron proteínas de delección de los 10, 15 ó 20 primeros aminoácidos de la TP completa así como fragmentos del dominio N-terminal de diferente longitud fusionados a YFP. La localización subcelular de estas proteínas mostró que los 15 primeros aminoácidos del dominio N-terminal son dispensables en la TP completa para localizar en el nucleóide bacteriano, pero no así los 20 primeros residuos, ya que la TP  $\Delta$ N20 presenta un patrón de localización homogéneo por toda la célula. Así, mientras que la TP  $\Delta$ N15 se une a DNA *in vitro* de manera similar a la TP *wild-type*, la TP  $\Delta$ N20 está muy afectada en su unión a DNA, fenotipos que serían consistentes con la localización en el nucleóide de la primera proteína y la localización por toda la célula de la segunda. Por otra parte, el fragmento mínimo ensayado que presenta una localización en el nucleóide bacteriano corresponde a los residuos 1 a 70. Estos resultados, junto con la mejor localización en el nucleóide de la proteína que contiene los dominios Nt+I que el dominio Nt solo, sugieren que la conformación de la proteína completa confiere más estabilidad para la localización en el nucleóide bacteriano. De acuerdo con esto, como se ha mostrado en los ensayos de retraso en gel con las diferentes proteínas de delección conteniendo los diferentes dominios de la TP, aunque el dominio N-terminal es suficiente y se requiere

para la interacción con el DNA *in vitro*, la proteína que contiene tanto el dominio Nt como el I (Nt+I) se une de manera más eficiente a DNA.

Mediante programas de predicción de estructura secundaria y experimentos de diroísmo circular hemos obtenido un mayor conocimiento sobre las características estructurales del dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$ . Así, hemos determinado que este dominio contiene aproximadamente un 60% de estructura en  $\alpha$ -hélice y que estaría compuesto por dos  $\alpha$ -hélices conectadas por un *loop* desordenado. Estas predicciones sugieren que la primera hélice del dominio N-terminal podría ver afectada su estructura en ausencia de los primeros 20 aminoácidos de la TP, lo que explicaría que la localización de la proteína  $\Delta N20$  no tenga lugar en el nucleóide bacteriano.

Por otra parte, mediante experimentos de X-ChiP hemos obtenido la primera evidencia directa de que la TP de  $\phi 29$  se une al DNA bacteriano *in vivo*. Además, los resultados obtenidos indican que existe cierta correlación entre la unión de la TP a DNA *in vivo* y la localización en el nucleóide bacteriano. Así, los mutantes puntuales que se unen peor al DNA *in vivo* son aquellos que tienen afectada su localización o que no localizan en el nucleóide bacteriano, respectivamente, esto es, las TPs mutantes K27A y K25A/K27A. Sin embargo, en el caso de las TPs mutantes R19A y K32A/K33A/K34A, aunque localizan en el nucleóide bacteriano, presentan una capacidad de unión a DNA *in vivo* bastante reducida con respecto a la TP *wild-type*. Por otro lado, hay que mencionar que la TP mutante que se une a DNA *in vivo* de manera más similar a la TP *wild-type* (K25A), lo hace de manera claramente menos eficiente que ésta. Estas TPs mutantes podrían tener una velocidad de disociación mayor que la TP *wild-type*, lo que se traduciría en un entrecruzamiento con el DNA menos eficiente. Adicionalmente, la estructura del nucleóide puede restringir la difusión de estas TPs mutantes que se asocian al DNA bacteriano, si bien lo hacen de manera menos eficiente que la TP *wild-type*. Por tanto, estos resultados sugieren que para que se dé una localización subcelular claramente por toda la célula, la unión a DNA tiene que estar muy afectada, no detectándose probablemente cambios más sutiles en la localización subcelular debidos a una unión a DNA defectiva mediante la técnica de microscopía de fluorescencia utilizada.

La cuantificación absoluta de las copias de DNA inmunoprecipitadas correspondientes a cada una de las cuatro regiones del genoma de *B. subtilis* analizadas sugiere que la unión de la TP a DNA *in vivo* tiene lugar de manera inespecífica de secuencia, ya que la TP se une de manera similar a estas regiones. Además, estos resultados indican que es probable que la TP se una a múltiples regiones del genoma de *B. subtilis*, independientemente de la posición que ocupen en él. No podemos descartar, sin embargo, que haya regiones del genoma bacteriano a las que la TP se una preferentemente y que no hayan sido detectadas en nuestro ensayo. Como se ha mostrado en el Capítulo 1, la TP producida como fusión a YFP se produce en cantidades suficientes como para complementar la infección con el fago mutante *sus3(91)*. Sin embargo, los experimentos de X-ChiP, al ser llevados a cabo en ausencia de

infección, podrían estar sobrevalorando las uniones TP-nucleoide, ya que la TP no sería susceptible de unirse al DNA viral o a otras proteínas virales, como por ejemplo la DNA polimerasa, y por tanto podría haber un exceso de TP libre en nuestro ensayo con respecto a la infección. Sería interesante analizar si la expresión de la TP durante la infección afecta los procesos de transcripción o replicación del genoma de *B. subtilis*.

Como se ha mostrado mediante experimentos de doble híbrido en levadura, la TP de  $\phi 29$  no interacciona con las proteínas asociadas al nucleoide de *B. subtilis* HBSu, Noc, SMC, y ScpA (Kohler and Marahiel 1997; Sievers *et al.*, 2002.; Wu and Errington, 2004; Lindow *et al.*, 2002b). Sin embargo, estas posibles interacciones podrían no haber sido detectadas en nuestros ensayos y no podemos descartar una interacción con otras proteínas de *B. subtilis* asociadas al nucleoide. En cualquier caso, puesto que la TP de  $\phi 29$  también localiza en el nucleoide de la bacteria distantemente relacionada *E. coli*, es improbable que esta localización pudiera estar ocurriendo por una interacción específica con una proteína celular.

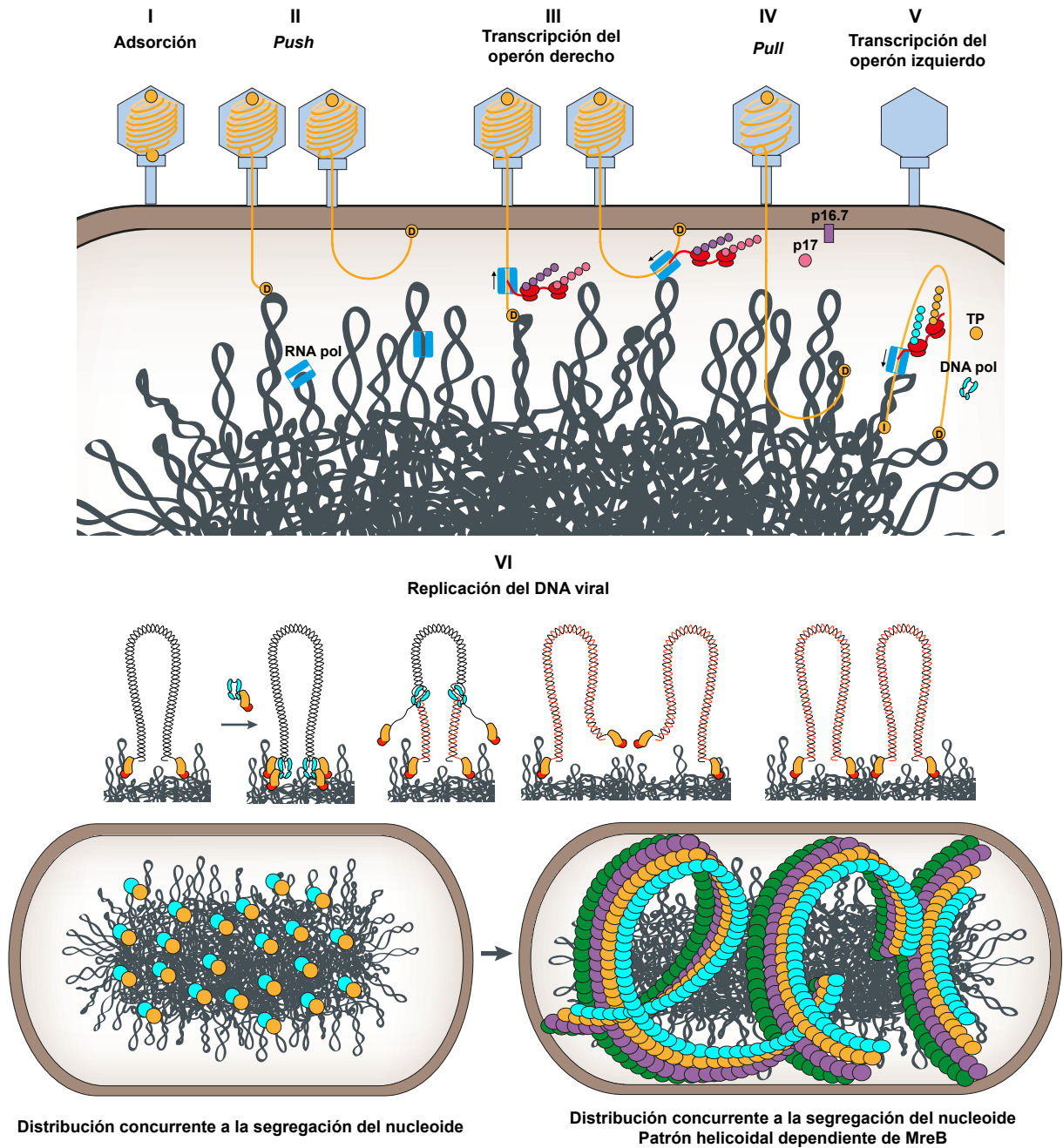
En esta Tesis hemos mostrado que la asociación de la TP con el nucleoide bacteriano es importante para que tenga lugar una replicación eficiente del DNA viral *in vivo*. Así, la expresión de la TP mutante  $\Delta Nt$ , que no se asocia con el nucleoide bacteriano, no complementa la infección del fago mutante *sus3*(91). En línea con este resultado, la replicación del DNA viral en estirpes de *B. subtilis* que expresan las TPs mutantes deficientes en la localización en el nucleoide K27A y K25A/K27A infectadas con el fago *sus3*(91) fue muy ineficiente. Promover la localización del genoma viral en el nucleoide bacteriano supondría un mecanismo de compartimentación de los componentes virales dentro de la célula, asegurando que el genoma del fago se encuentre en las localizaciones óptimas para que tenga lugar su transcripción. De esta manera, se garantizaría el acceso del TP-DNA a la RNA polimerasa bacteriana, que colocaliza con el nucleoide bacteriano (Lewis *et al.*, 2000; Berlatzky *et al.*, 2008; Cabrera *et al.*, 2009; Bratton *et al.*, 2011; Bakshi *et al.*, 2012; esta tesis). Además, la replicación del genoma viral probablemente ocurra en las inmediaciones del nucleoide bacteriano, ya que la TP parental se encuentra en esta localización en etapas tempranas de la infección. De acuerdo con esto, en experimentos donde se inhibe la DNA polimerasa viral con 6-(p-hidroxifenilazo)-uracilo y se utiliza el análogo de timidina BrdU para marcar el DNA de  $\phi 29$  de nueva síntesis, se determinó que éste comienza a detectarse en el nucleoide bacteriano (Meijer *et al.*, 2000). Además, los dNTPs y las enzimas encargadas de su síntesis se encuentran concentrados en el nucleoide (Mathews and Sinha, 1982; Molina and Skarstad, 2004; Sánchez-Romero *et al.*, 2010). Por otra parte, la asociación del TP-DNA con el DNA bacteriano podría ayudar a estabilizar las interacciones que se producen en los orígenes de replicación para iniciar la replicación del DNA viral.

Estudios anteriores determinaron que el genoma del fago, aun siendo lineal, se encuentra topológicamente restringido *in vivo*. Además, se determinó que el uso de inhibidores de la DNA girasa



bacteriana como la novobiocina y el ácido nalidíxico afectan la eficiencia de la replicación del DNA viral (González-Huici *et al.*, 2004b). Por tanto, el estado topológico del DNA viral sería un factor importante para la eficiencia de las transacciones que ocurren sobre éste, como son la transcripción y la replicación. Así, basándonos en los resultados de localización de la TP parental y de la TP fusionada a YFP en el nucleóide bacteriano, proponemos que el DNA viral se encontraría topológicamente restringido mediante su unión al nucleóide bacteriano a través de las TPs parentales.

Basándonos en los resultados obtenidos en esta Tesis y los datos de trabajos anteriores, proponemos la secuencia de eventos que tendrían lugar en la célula infectada para llevar a cabo una replicación eficiente del DNA viral (**Figura 45**). En primer lugar, para que ocurra la replicación del genoma viral, el fago requiere la expresión de los genes tempranos implicados en este proceso. Como se ha mencionado en la Introducción, la inyección del genoma viral ocurre en dos etapas diferenciadas: la etapa de *push*, en la que se produce la inyección desde el extremo derecho de aproximadamente el 65% del TP-DNA de manera pasiva, mediante la liberación de la presión generada en la cápsida del fago durante el empaquetamiento, y la etapa de *pull*, que necesita la expresión de (al menos) las proteínas p16.7 y p17, codificadas por genes del extremo derecho del genoma, que ha sido internalizado (González-Huici *et al.*, 2004a). Por ello, la transcripción del extremo derecho del genoma viral ocurriría probablemente cerca de la membrana de la célula, ya que parte del genoma viral aún no ha sido internalizado totalmente en el citoplasma. En *B. subtilis* la RNA polimerasa localiza principalmente en las regiones externas del nucleóide (Lewis *et al.*, 2000) debido probablemente a una mayor accesibilidad de estas regiones para la maquinaria transcripcional. Por otra parte, puesto que la proteína p16.7 es una proteína de membrana, la transcripción del extremo derecho del genoma viral podría ocurrir mediante el proceso de transcripción de p16.7, es decir, su transcripción y traducción acoplada a la inserción en la membrana. Una vez sintetizadas las proteínas del operón temprano derecho p16.7 y p17, se produciría la internalización del resto del genoma viral, proceso que dependería de la fuerza motriz de la membrana (González-Huici *et al.*, 2006). Además, se sabe que el DNA tiene que estar superenrollado negativamente para que se produzca la segunda etapa de *pull*, estado que podría adquirir mediante la unión del TP-DNA a la membrana o al DNA bacteriano (Bravo *et al.*, 1997; Serna-Rico *et al.*, 2002; 2003; esta Tesis). Una vez internalizado el genoma completo, se produciría la transcripción de los principales genes implicados en la replicación del DNA viral, situados en el extremo izquierdo del genoma del fago. Esta etapa de transcripción seguramente tenga lugar asociada al nucleóide bacteriano, ya que la TP parental colocaliza con el nucleóide bacteriano a 15 min post-infección. Esta asociación se produciría mediante la unión de la TP parental al DNA bacteriano de manera inespecífica mediante su dominio N-terminal. La presencia de la TP en el nucleóide bacteriano determinaría la localización de la DNA polimerasa viral en estas localizaciones, donde se produciría la replicación del DNA viral. A medida que progresa el ciclo celular y la bacteria va creciendo longitudinalmente, la replicación



**Figura 45. Representación esquemática de las diferentes etapas de la infección del bacteriófago  $\phi 29$ .** (I) El fago se adsorbe de manera irreversible a la pared bacteriana. (II) Se produce la inyección del ~65% del genoma viral (conocida como etapa de *push*), con una polaridad de derecha a izquierda. (III) Se transcribe el operón situado en el extremo derecho del genoma viral, que codifica las proteínas p16.7 y p17. El mantenimiento de la topología adecuada para la transcripción del genoma viral o para el proceso de *pull* de la parte restante del genoma viral se llevaría a cabo mediante la unión de la TP parental al nucleóide o a la membrana plasmática. (IV) Se produce la etapa de *pull*, mediada por las proteínas p16.7 y p17. (V) Una vez internalizado el genoma viral completo se produce la transcripción del operón situado en el extremo izquierdo del genoma viral, que codifica las principales proteínas implicadas en la replicación del genoma, como la TP y la DNA polimerasa. (VI) El TP-DNA (representado en naranja) localiza en el nucleóide, uniéndose al genoma bacteriano a través del dominio N-terminal de la TP. La TP determina la localización de la DNA polimerasa (círculos azules) en el nucleóide bacteriano, donde se produce la replicación del genoma viral. A medida que avanza el ciclo celular se produce una relocalización de la TP y la DNA polimerasa viral siguiendo un patrón helicoidal. Esta localización dependería de la proteína del citoesqueleto de actina bacteriano MreB, siguiendo la red de interacciones MreB (hélices verdes)-p16.7 (hélices violeta)-TP-DNA (hélices naranjas)-DNA polimerasa (hélices azules).

del fago se distribuye de manera concurrente a la segregación del nucleoide bacteriano, siguiendo un patrón helicoidal que depende de la proteína viral p16.7 y del citoesqueleto bacteriano (Muñoz-Espín *et al.*, 2009; esta Tesis). Finalmente, en etapas tardías del ciclo se produciría el empaquetamiento del DNA viral con una polaridad de izquierda a derecha (Bjornsti *et al.*, 1983), probablemente en la región del nucleoide, de acuerdo con estudios previos en los que el análisis por microscopía electrónica de secciones finas de la bacteria infectada mostró que las partículas de fago maduras localizan en la región central de la célula (Hagen *et al.*, 1976; Jiménez *et al.*, 1977).

La utilización de elementos del citoesqueleto ha sido descrita en otros sistemas procarióticos. Muchos fagos lisogénicos se replican a la manera de plásmidos de bajo número de copias de forma independiente del genoma bacteriano y codifican sistemas de segregación propios para asegurar su propagación de una manera eficaz. Por ejemplo, el fago P1 codifica una ATPasa de la familia conservada de proteínas citoesqueléticas ParA para su segregación. Estas proteínas utilizan un conjunto de residuos básicos para la unión inespecífica a DNA (Hester and Lutkenhaus, 2007; Castaing *et al.*, 2008; Soberón *et al.*, 2011) y se ha propuesto que segregarían los plásmidos replicados mediante un mecanismo de *diffusion/ratchet* utilizando el nucleoide como matriz para el movimiento (revisado en Vecchiarelli *et al.*, 2012). En el caso de proteínas ParA codificadas por plásmidos se ha visto que mutaciones que afectan la unión al DNA del nucleoide se traducen en defectos en el proceso de partición *in vivo* (Hester and Lutkenhaus, 2007; Castaing *et al.*, 2008). Mientras que la mayoría de los fagos autoreplicativos dependen de miembros de la familia ParA para la segregación del DNA viral, estudios recientes han determinado que el fago de *Clostridium botulinum* C-st codifica un elemento citoesquelético de tubulina (perteneciente a la familia TubZ) que promovería la segregación del DNA viral durante la pseudo-lisogenia (Oliva *et al.*, 2012). Además, en el caso del fago de *Pseudomonas chlororaphis* 201  $\phi$ 2-1, éste codifica una proteína similar a tubulina (PhuZ) que posiciona el DNA viral en localizaciones celulares centrales, lo que se ha propuesto que permitiría una replicación eficiente del DNA viral así como el empaquetamiento de éste en las cápsidas (Kraemer *et al.*, 2012; Erb *et al.*, 2014). El fago de *Pseudomonas aeruginosa*  $\phi$ KZ también codifica un homólogo de tubulina, aunque su función está siendo investigada (Aylett *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha descrito recientemente que la proteína MreB es importante para la replicación del fago de *Geobacillus* sp. GVE2 *in vivo*, e induce la distribución polar de los viriones durante la infección (Jin *et al.*, 2014). Por tanto, la utilización de componentes del citoesqueleto, ya sea del hospedador o codificados por el propio virus, supondría una estrategia conservada para asegurar una replicación y segregación eficientes del DNA de estos replicones. Es importante mencionar que, tal y como se ha indicado en la Introducción, los componentes del citoesqueleto de actina en *B. subtilis* MreB, Mbl y MreBH fusionados a GFP no forman estructuras helicoidales continuas sino parches discretos en la periferia celular dando lugar a una configuración tipo hélice discontinua (Domínguez-Escobar *et al.*, 2011; Garner *et al.*, 2011). Utilizando técnicas de

fluorescencia de este tipo no descartamos que la localización de la maquinaria replicativa de  $\phi 29$  siga también esta organización, ya que su distribución depende del citoesqueleto bacteriano y es probable que siga una disposición similar.

De manera adicional, la TP de  $\phi 29$  podría estar dirigiendo y asociando el genoma viral al nucleóide con el fin de aprovechar la dinámica del cromosoma bacteriano. La estrategia de mantener y segregar el genoma viral mediante el anclaje de éste al DNA celular es común entre diversos virus de células eucariotas como los papilomavirus, bornavirus y algunos gamma herpesvirus como el virus de Epstein-Barr. Estos virus codifican proteínas que se unen de manera específica a secuencias del DNA viral y anclan éste a los cromosomas mitóticos mediante la unión a proteínas asociadas a éstos (revisado en McBride, 2008, McBride *et al.*, 2012 y Knipe *et al.*, 2013; Matsumoto *et al.*, 2012). Asimismo, la asociación del DNA viral a sitios de cromatina activa asegura que el genoma del virus se mantenga transcripcionalmente activo.

La localización y/o asociación de las TPs de fagos al nucleóide bacteriano podría ser una función altamente conservada entre estas proteínas, ya que, como se ha mostrado en esta Tesis, la TP del fago PRD1, que infecta *E. coli*, también localiza en el nucleóide bacteriano en ausencia de otros componentes virales. Además, tanto la TP de  $\phi 29$  como la TP de PRD1 localizan en el nucleóide de bacterias que no son el hospedador natural del virus, como son *E. coli* y *B. subtilis*, respectivamente. Por otra parte, muchas de las secuencias de TPs de fagos como Nf, GA-1, Cp1,  $\phi$ CP24R, AV-1, ascc $\phi$ 28, Bam35 y PRD1 contienen una alta proporción de residuos básicos, algunos de ellos agrupados en *clusters*, lo que sugiere que la capacidad de unión a DNA podría ser una función conservada en las TPs (Redrejo-Rodríguez *et al.*, 2012). Asimismo, Redrejo-Rodríguez y colaboradores han mostrado que las TPs de los fagos de la familia de  $\phi 29$  Nf y GA-1 localizan en el nucleóide de *E. coli* (Redrejo-Rodríguez *et al.*, 2013). Por otra parte, en este trabajo se determinó que, al igual que ocurre en *B. subtilis*, el dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$  es suficiente para la localización en el nucleóide de *E. coli* (Redrejo-Rodríguez *et al.*, 2013). Se ha descrito recientemente que la TP de  $\phi 29$  contiene una NLS (*nuclear localization signal*, por sus siglas en inglés) funcional, dirigiendo la localización de la proteína al núcleo de células eucariotas. La mayoría de los dominios de unión a DNA y NLSs contienen una alta proporción de residuos básicos, y en muchos casos ambos dominios solapan en la secuencia de la proteína (LaCasse and Lefebvre, 1995; Cokol *et al.*, 2000). Así, al igual que el dominio de unión a DNA, la NLS de la TP de  $\phi 29$  se encuentra en el dominio N-terminal, comprendiendo los residuos 1 a 37 (Redrejo-Rodríguez *et al.*, 2012). En células eucarióticas, el fragmento N-terminal que contiene los residuos 1-37 es suficiente para localizar en el núcleo, mientras que en el caso de la localización en el nucleóide bacteriano es necesario el fragmento 1-70. Por tanto, la capacidad de unión a DNA parece tener unos requerimientos más estrictos (probablemente en términos de plegamiento de la proteína) que la capacidad de localización en el núcleo eucariótico, la cual es normalmente más dependiente de la

secuencia primaria de la proteína. Además, es importante destacar que tanto la mutación K27A como K25A/K27A, que como se ha mostrado en la presente tesis afectan tanto la capacidad de unión a DNA de la TP como la de localización en el nucleóide bacteriano, impiden la localización de esta proteína en el núcleo eucariótico (Redrejo-Rodríguez *et al.*, 2012). En este sentido, se ha sugerido que algunas NLSs podrían haber evolucionado a partir de fragmentos de dominios de unión a DNA enriquecidos en residuos básicos para compartimentar proteínas en el núcleo eucariótico, un compartimento celular nuevo, que no existía en las células procarióticas precedentes (Cokol *et al.*, 2000).

Los adenovirus son una familia de virus eucarióticos que presentan una gran analogía con  $\phi 29$ , tanto en el proceso de replicación, que también ocurre mediante un mecanismo de replicación iniciada con proteína terminal, como en la organización de la replicación dentro de la célula. En adenovirus la replicación ocurre en el núcleo celular y se ha mostrado que la matriz nuclear actúa como una plataforma hacia la que son reclutadas diferentes proteínas virales (Bodnar *et al.*, 1989; Bridge and Petterson, 1995; de Jong and van der Vliet, 1999). Así, se ha visto que la pTP (pre-TP) de adenovirus es necesaria para la asociación del DNA viral con la matriz nuclear, siendo este anclaje importante para que tenga lugar una transcripción eficiente del genoma viral (Schaack *et al.*, 1990; Fredman and Engler, 1993). Por otra parte, la localización nuclear de la replicación de adenovirus depende en gran medida de la pTP, que contiene una NLS y facilita la importación al núcleo de la DNA polimerasa de adenovirus mediante la interacción con ésta (Zhao y Padmanabhan, 1988). Además, la pTP interacciona directamente con la enzima presente en la matriz nuclear CAD (carbamoil-fosfato sintetasa, aspartato transcarbamoilasa y dihidroorotasa), la cual es esencial para la síntesis de pirimidinas (Angeletti and Engler, 1998). Esta interacción con la enzima CAD podría proporcionar una alta concentración local de dNTPs, necesarios para la replicación eficiente del virus.

En conclusión, tanto los virus que infectan eucariotas como los que infectan procariotas utilizan estructuras de su hospedador para llevar a cabo una compartimentación de procesos como la replicación, la transcripción y el empaquetamiento del DNA (Schaack *et al.*, 1990; Novoa *et al.*, 2005; Radtke *et al.*, 2006; Muñoz-Espín *et al.*, 2009; Netherton and Wileman, 2011). La estrategia de compartimentar ciertos procesos virales dentro de la célula hospedadora permite la concentración de componentes virales en un lugar específico, aumentando de esta manera la eficiencia del proceso. Por tanto, como se ha determinado en esta Tesis, las TPs, aparte de su función esencial como cebadoras de la replicación del DNA viral, constituyen una herramienta adicional para explotar los recursos de la célula hospedadora en beneficio del propio virus.



### 2. Papel del dominio N-terminal de la TP de $\phi 29$ en la replicación del DNA viral *in vitro*

En todos los organismos, la replicación del DNA tiene lugar en tres etapas: iniciación en los orígenes de replicación, elongación o síntesis de DNA desde las horquillas de replicación y terminación. Cada uno de estos procesos tiene lugar de una manera altamente coordinada y precisa a través de múltiples interacciones proteína-proteína y proteína-DNA. El correcto cumplimiento de las primeras etapas de la replicación del DNA es crucial para la eficiencia de este proceso, siendo la iniciación la etapa que está sometida a más mecanismos de regulación (revisado en Mott and Berger, 2007 y Katayama *et al.*, 2010).

En la presente Tesis se ha profundizado en el conocimiento de los primeros pasos de la replicación del TP-DNA de  $\phi 29$  mediante la caracterización bioquímica de mutantes de la TP, proteína cebadora de la iniciación de la replicación del DNA viral. Así, hemos determinado que los mutantes de la TP en el dominio N-terminal que están más afectados en unión a DNA presentan defectos en la replicación del TP-DNA, concretamente en las etapas de iniciación y transición, y que la proteína p6 es crucial para contrarrestar estos defectos. De acuerdo con esto, los ensayos de transición muestran que utilizando las TPs mutantes más afectadas en unión a DNA, es decir, TP  $\Delta$ Nt, K27A y K25A/K27A, como cebadores de la iniciación, sólo se produce una pequeña cantidad del producto de iniciación TP-dAMP, y no se producen incorporaciones adicionales a no ser que la proteína p6 sea añadida en la reacción. Se ha descrito que la reacción de iniciación requiere una concentración de dATP menor que la incorporación del segundo nucleótido y de los nucleótidos subsiguientes (Blanco *et al.*, 1986; Blanco *et al.*, 1988). Por otra parte, estudios anteriores determinaron que tanto la reacción de iniciación como la transición son estimuladas por la proteína p6, la cual disminuye la  $K_m$  de la DNA polimerasa por el nucleótido iniciador (Pastrana *et al.*, 1985; Blanco *et al.*, 1986; Blanco *et al.*, 1988). Por tanto, estos datos sugerirían que la deficiencia en las reacciones de iniciación y transición por parte de los mutantes de la TP en el dominio N-terminal podría ser debida a una menor afinidad de la DNA polimerasa por el nucleótido cuando utiliza estas TPs como cebadores. De acuerdo con esto, la medida de la  $K_m$  de la DNA polimerasa por dATP utilizando las TPs mutantes K27A y K25A/K27A como cebadores mostró que ésta está aumentada en aproximadamente 8 y 12 veces, respectivamente, con respecto a la  $K_m$  de la DNA polimerasa cuando utiliza la TP *wild-type* como cebador. Es importante señalar que, en presencia de la proteína p6, la  $K_m$  de la DNA polimerasa por dATP es más similar utilizando la TP *wild-type* o las TPs mutantes K27A y K25A/K27A como cebadores. De hecho, en presencia de estas TPs mutantes la  $K_m$  de la DNA polimerasa por el nucleótido iniciador es 1,7 veces menor que utilizando la TP *wild-type* como iniciadora, lo que podría ser debido a un posicionamiento del dATP más favorable en el centro activo de la DNA polimerasa cuando utiliza estas TPs mutantes como iniciadoras en presencia

de p6. Considerando estos datos, la pregunta que se plantea entonces es: ¿por qué la  $K_m$  de la DNA polimerasa por dATP es mayor cuando utiliza las TPs mutantes K27A o K25A/K27A como cebadores en lugar de la TP *wild-type*? En base a los resultados obtenidos proponemos que la unión de la TP al TP-DNA mediante su dominio N-terminal es importante para lograr un correcto posicionamiento del residuo iniciador (Ser232) en el centro activo de la DNA polimerasa. Así, una unión a DNA deficiente por parte de las TPs mutantes en el dominio N-terminal provocará un incorrecto posicionamiento del residuo iniciador y, por tanto, una iniciación menos eficiente. De acuerdo con esto, la eficiencia de iniciación de las TPs mutantes es más cercana a la eficiencia de la TP *wild-type* en ausencia de TP-DNA que en su presencia. Es interesante señalar que en la estructura cristalográfica del heterodímero DNA polimerasa/TP el *priming loop* (residuos 227 a 233) se encuentra desordenado, probablemente debido a la ausencia de molde y/o del dNTP entrante (Kamtekar *et al.*, 2006), que podrían estabilizar esta región de la TP.

Como se ha mostrado a lo largo del Capítulo 3 de esta Tesis, la proteína p6 contrarresta los defectos presentados por las TPs mutantes en el dominio N-terminal en las diferentes etapas del proceso de replicación del TP-DNA de  $\phi 29$ . Así pues, ¿cuál es el proceso por el cual la p6 contrarresta los defectos de estas TPs mutantes, llegando a hacer incluso prescindible la presencia del dominio N-terminal? Una posibilidad es que la unión de la proteína p6 al DNA del origen de replicación, la cual se ha descrito que induce un cambio conformacional en este DNA (Prieto *et al.*, 1988), favorezca el posicionamiento del *priming loop* de las TPs mutantes en el centro activo de la DNA polimerasa. Este posicionamiento favorecido podría ser debido a un mejor reconocimiento por parte de las TPs mutantes de este DNA con p6 unida, o a la separación de ambas cadenas del DNA inducida por p6, que haga que la unión de la TP al DNA para posicionarse correctamente sea prescindible. El hecho de que el mutante de delección  $\Delta Nt$  pueda catalizar la reacción de iniciación de manera *wild-type* en presencia de la proteína p6 podría indicar que los efectos producidos por la unión a DNA de la TP y la proteína p6 son similares (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2007). De acuerdo con este planteamiento, Gella y colaboradores (Gella *et al.*, 2014) han determinado que el dominio N-terminal de la TP es importante para la iniciación en un origen de replicación sintético (oligonucleótidos de 68-mer correspondientes al extremo derecho del genoma de  $\phi 29$ , sin TP parental) que tiene los 3 primeros pb desapareados, pero que es menos importante para la iniciación en un origen con 6 pb desapareados. Esto sugiere que el dominio N-terminal de la TP podría tener una actividad desestabilizante o de apertura de la doble hélice. De acuerdo con esto, la replicación del TP-DNA *in vitro* puede ocurrir en ausencia de la proteína p6 (Blanco *et al.*, 1989), lo que indica que alguna de las proteínas del heterodímero DNA polimerasa/TP podrían llevar a cabo el *unwinding* inicial. Además, se determinó que la estimulación producida por la adición de p6 en estos orígenes desapareados es menor que en los orígenes sin desaparecer, indicando que uno de los efectos que p6 genera sobre el DNA es la apertura de la doble hélice, si bien sigue existiendo cierto nivel de estimulación por parte de p6 en los orígenes desapareados (Gella *et al.*, 2014), lo que

sugiere un mecanismo de estimulación adicional, como podría ser el reclutamiento del heterodímero hacia los orígenes de replicación. Así, otra posibilidad adicional pero no excluyente que explicaría la estimulación de la reacción de iniciación por parte de la proteína p6 cuando se utilizan mutantes de la TP en el dominio N-terminal como cebadores podría ser que la proteína p6 interaccionase con la DNA polimerasa, induciendo un cambio conformacional en su sitio activo que lo haga menos restrictivo en cuanto al posicionamiento de sus sustratos. En base a estudios bioquímicos, varios trabajos previos sugieren una interacción p6-DNA polimerasa (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2007; Truniger *et al.*, 1998). En la presente Tesis no se pudo detectar una interacción estable entre estas proteínas, ni entre la p6 y la TP, mediante ensayos de ultracentrifugación en gradiente de glicerol. Sin embargo, esta posible interacción podría ser transitoria o dependiente de DNA, y por tanto no podría ser detectada por este método. Es importante destacar que la proteína p6 forma un complejo dinámico con el DNA (Gutiérrez *et al.*, 1994) y que una interacción fuerte entre la DNA polimerasa y la p6 sería desfavorable para una amplificación eficiente del molde.

La estructura cristalográfica del heterodímero DNA polimerasa/TP sugiere que el dominio N-terminal de la TP no mantiene contactos con la DNA polimerasa (Kamtekar *et al.*, 2006). Los resultados de interferencia mostrados en el Capítulo 3 muestran que el mutante de delección  $\Delta Nt$  interacciona con la DNA polimerasa de forma menos eficiente que la TP *wild-type*, indicando, por tanto, que el dominio N-terminal de la TP estaría implicado en la interacción con la DNA polimerasa, aunque probablemente de manera indirecta. Estos resultados sugieren que el dominio N-terminal de la TP podría estar implicado en conferir a esta proteína la conformación adecuada para unirse de manera eficiente a la DNA polimerasa (o conferir a la DNA polimerasa la conformación adecuada para unirse a la TP). Esta conformación adecuada se conseguiría mediante la unión de la TP al TP-DNA, si bien en presencia de la proteína p6 esta unión sería dispensable, ya que el mutante de delección que carece del dominio N-terminal (TP  $\Delta Nt$ ) puede unirse a la DNA polimerasa de manera similar a la TP *wild-type* en presencia de la proteína p6.

Se ha propuesto que el dominio C-terminal de la TP mimetizaría al dsDNA en sus interacciones con la DNA polimerasa, ya que ambos ocupan el mismo lugar en el centro activo de la DNA polimerasa (Kamtekar *et al.*, 2006; Berman *et al.*, 2007). En consecuencia, se ha demostrado que mutantes de la DNA polimerasa afectados en unión a la TP también lo están en la unión a DNA (Blasco *et al.*, 1995; de Vega *et al.*, 1998; Méndez *et al.*, 1994; Truniger *et al.*, 1998; Truniger *et al.*, 1999). Esto explicaría la incapacidad de la DNA polimerasa para iniciar en regiones internas del DNA, ya que la TP bloquea casi completamente el túnel de unión del DNA (Kamtekar *et al.*, 2006). De hecho, estudios bioquímicos han mostrado que la unión de la DNA polimerasa a la TP impide la unión y polimerización por parte de la DNA polimerasa a una estructura molde-iniciador (de Vega *et al.*, 1998). Por tanto, es muy probable que el dominio N-terminal de la TP sea el componente del heterodímero encargado de unirse al origen de



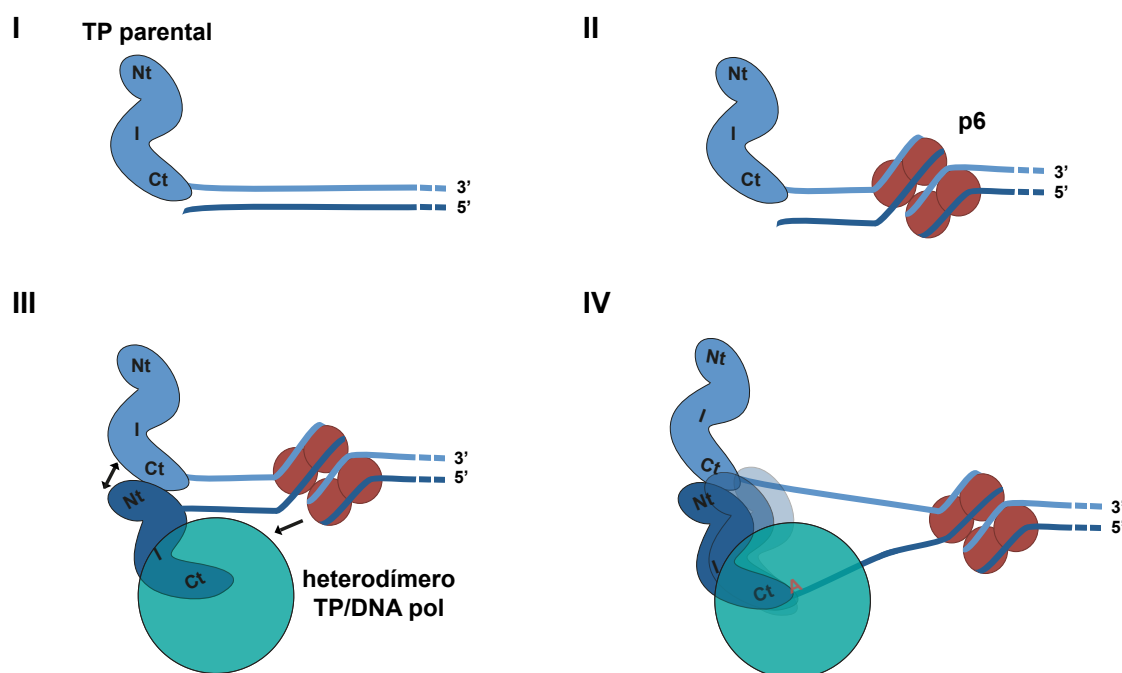
replicación o estabilizar la unión del heterodímero durante la etapa de iniciación, ya que la región de la DNA polimerasa que podría hacerlo está ocupada por el dominio iniciador de la TP, al menos hasta que finaliza la etapa de transición.

La presencia de la TP parental en el origen de replicación aumenta la eficiencia de la reacción de iniciación entre 6 y 10 veces con respecto a la reacción sin molde (Gutiérrez *et al.*, 1986; González-Huici *et al.*, 2000). Este aumento de la eficiencia podría ser debido a un reclutamiento del heterodímero favorecido mediante interacciones con la TP parental. Además, el hecho de que la TP pueda interactuar consigo misma (Ortín *et al.*, 1971; Salas *et al.*, 1978; Bravo *et al.*, 2000; Serna-Rico *et al.*, 2003), sugiere que el reconocimiento de la TP parental en el origen podría estar mediado por interacciones con la TP cebadora. En la presente Tesis se ha mostrado que la presencia del dominio N-terminal en al menos una de las dos TPs presentes en el origen de replicación durante la iniciación (TP iniciadora y TP parental) es necesaria para una amplificación eficiente del TP-DNA, lo que sugiere un modelo de interacción cruzada entre el dominio N-terminal de una de las TPs implicadas en la interacción y el dominio intermedio o C-terminal de la otra TP. Futuros ensayos de interacción utilizando los diferentes dominios de la TP arrojarán luz sobre estas hipótesis. Asimismo, los mutantes puntuales K27A y K25A/K27A presentan una amplificación deficiente con respecto a la TP *wild-type*, lo que podría sugerir un papel de estos residuos en la dimerización. Es importante destacar que los fenotipos mostrados por las TPs mutantes en el dominio N-terminal en la amplificación *in vitro* del TP-DNA de  $\phi 29$  tienen reflejo en el proceso de infección *in vivo*, ya que los mutantes puntuales K27A y K25A/K27A y el mutante de delección  $\Delta Nt$ , son menos eficientes o no complementan, respectivamente, la infección con el fago mutante *sus3(91)* (ver **Figura 33**). Durante la infección la proteína p6 se encuentra presente y por tanto los defectos en iniciación y replicación de estas TPs mutantes serían probablemente contrarrestados. Sin embargo, si las condiciones que se dan *in vitro* fueran similares a las que ocurren *in vivo*, sería probable que estas TPs mutantes no amplificasen el DNA viral durante la infección. La TP se encuentra en cantidades superiores a la DNA polimerasa (~10 veces) durante la infección (Bravo and Salas, 1997). En condiciones de exceso de TP mutante  $\Delta Nt$  sobre la DNA polimerasa, resultados de Pérez-Arnaiz y colaboradores muestran que esta TP mutante es capaz de amplificar el TP-DNA *in vitro*, aunque de manera menos eficiente a como lo hace la TP *wild-type* (39%) (Pérez-Arnaiz *et al.*, 2007). Sin embargo, con los datos obtenidos hasta la fecha no podemos excluir la posibilidad de que la incapacidad por parte de la TP  $\Delta Nt$  de complementar la infección con un fago mutante *sus3(91)* cuando es suministrada en *trans* sea debida a su no localización en el nucleóide bacteriano o a su amplificación defectiva.

Integrando los resultados derivados de esta Tesis y los obtenidos previamente, presentamos un modelo sobre los primeros pasos que tendrían lugar durante el inicio de la replicación del TP-DNA de  $\phi 29$  *in vitro* (**Figura 46**). La primera proteína en unirse a los orígenes de replicación sería la proteína

## Discusión

p6, que induciría un cambio conformacional en los orígenes de replicación (I y II). El reconocimiento posterior por el heterodímero del origen de replicación al que se ha unido previamente la proteína p6 podría ser mediado mediante interacciones entre la proteína p6 y algún componente del heterodímero o mediante el favorecimiento de la unión de la TP al DNA (III). Esta unión de la TP al DNA tendría lugar a través de su dominio N-terminal, lo que probablemente provoque cierta apertura del origen, y produciría una estabilización del *loop* iniciador de la TP en el centro activo de la DNA polimerasa, permitiendo de esta manera una reacción de iniciación eficiente (IV).



**Figura 46. Representación esquemática de las diferentes interacciones DNA-proteína y proteína-proteína en la iniciación de la replicación del TP-DNA de  $\phi 29$  *in vitro*.** (I) La TP parental (azul claro) se encuentra covalentemente unida a los extremos 5' del DNA viral. (II) La proteína p6 (esferas rojas) se une al DNA del origen produciendo un cambio conformacional que favorecería el reconocimiento posterior por el heterodímero (la DNA polimerasa se muestra como una esfera verde). (III) El dominio N-terminal (Nt) de la TP iniciadora (azul oscuro) reconocería el origen de replicación mediante la unión a DNA, e interaccionaría con el dominio C-terminal (Ct) y/o intermedio (I) de la TP parental (interacción indicada con una flecha bidireccional). Los contactos potenciales de la proteína p6 con alguno de los componentes del heterodímero se presentan con una flecha. (IV) La interacción potencial de la TP iniciadora con la TP parental o con el ssDNA de la banda desplazada podría estabilizar la interacción con la DNA polimerasa durante la reacción de iniciación.

En células de *B. subtilis* infectadas, la proteína p6 está presente en grandes cantidades (alrededor de 700.000 moléculas por célula a tiempos tardíos post-infección) (Abril *et al.*, 1997). Como se ha sugerido para la proteína de unión a DNA de adenovirus, DBP (Mul *et al.*, 1993), la actividad de la proteína p6 de disminuir la  $K_m$  de la DNA polimerasa podría compensar una baja disponibilidad de dNTPs para la maquinaria replicativa viral durante la infección, facilitando de esta manera la eficiencia de la replicación del fago *in vivo*. Al igual que la TP de  $\phi 29$ , se ha descrito que la pTP de adenovirus se

une a DNA (tanto ssDNA como dsDNA) de manera inespecífica de secuencia (de Jong *et al.*, 2003). Además, la región de unión a DNA se localiza en su región N-terminal y comprende residuos básicos. Es interesante señalar que mutantes de la pTP de adenovirus afectados en unión a DNA están afectados en la iniciación de la replicación, sugiriendo que, al igual que ocurre con  $\phi 29$ , la capacidad de unión a DNA de la TP es importante para este proceso (Botting and Hay., 2001). Además, se ha determinado que la pTP puede oligomerizar *in vitro* (de Jong *et al.*, 2003). Así, se propuso que la unión de la pTP al DNA y su potencial interacción con la TP parental podrían estabilizar el heterodímero pTP/pol en los orígenes de replicación (de Jong *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha determinado que mutaciones en los residuos de la pTP Asp578 y Asp582, cercanos al residuo iniciador Ser580, afectan la cinética de iniciación, incrementando la  $K_m$  de la DNA polimerasa por dCMP (Mysiak *et al.*, 2004). En el caso de  $\phi 29$ , hasta ahora sólo habían sido descritos residuos de la DNA polimerasa que afectasen la cinética de la iniciación (Dufour *et al.*, 2000; Truniger *et al.*, 2002a; 2002b; Truniger *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2014). En la presente Tesis se ha determinado que residuos de la TP implicados en la unión a DNA afectan la  $K_m$  de la DNA polimerasa por el nucleótido iniciador, destacando la importancia que tiene la capacidad de unión a DNA de la TP durante las primeras etapas de la replicación.

En resumen, los resultados obtenidos en esta Tesis proponen un nuevo papel del dominio N-terminal de la TP en las primeras etapas de la replicación: facilitar el reconocimiento del origen de replicación por el heterodímero mediante su unión a DNA y desestabilizar la hélice o permitir la apertura de ésta, posibilitando de esta manera un posicionamiento correcto del heterodímero para llevar a cabo una catálisis de la reacción de iniciación de manera eficiente.



## Conclusiones

---



1. La TP del bacteriófago  $\phi 29$  localiza en el nucleóide de *B. subtilis* y de *E. coli*, de manera independiente de otros componentes virales. La TP parental del bacteriófago  $\phi 29$  localiza en el nucleóide de *B. subtilis* de manera independiente de la TP iniciadora.
2. La TP del bacteriófago PRD1 localiza en el nucleóide de *E. coli* y de *B. subtilis*, de manera independiente de otros componentes virales.
3. La TP del bacteriófago  $\phi 29$  determina la localización subcelular de la DNA polimerasa viral, probablemente mediante una interacción directa entre ambas proteínas. Durante el ciclo infeccioso ambas proteínas colocalizan con el nucleóide bacteriano, siguiendo la dinámica de segregación del cromosoma. Tanto la TP como la DNA polimerasa viral se distribuyen formando un patrón tipo helicoidal en etapas tardías del ciclo celular en células infectadas, patrón que depende de la proteína del citoesqueleto de actina bacteriano MreB.
4. El dominio responsable de la localización de la TP del bacteriófago  $\phi 29$  en el nucleóide de *B. subtilis* es el dominio N-terminal. El fragmento mínimo de la TP para la localización en el nucleóide bacteriano comprende los residuos 1 a 70 y los 15 primeros aminoácidos de la TP son dispensables en la proteína completa para la localización en el nucleóide bacteriano. El dominio N-terminal tiene un contenido en  $\alpha$ -hélice del 60%, y está formado por dos  $\alpha$ -hélices conectadas por un *loop* desordenado según predicciones de estructura secundaria.
5. El dominio N-terminal de la TP del bacteriófago  $\phi 29$  es necesario para una replicación eficiente del DNA viral *in vivo*.
6. La TP del bacteriófago  $\phi 29$  se une al DNA genómico de *B. subtilis* *in vivo*, de manera inespecífica de secuencia. Los residuos Arg19, Lys25 y Lys27, y la combinación de residuos Lys25/Lys27 y Lys32/Lys33/Lys34 del dominio N-terminal de la TP de  $\phi 29$  están implicados en la unión a DNA. El residuo Lys27 y la combinación de residuos Lys25/Lys27 de la TP de  $\phi 29$  afectan en gran medida la unión a DNA *in vivo* y, por consiguiente, son importantes para la localización de la TP en el nucleóide de *B. subtilis*.
7. La unión a DNA de la TP de  $\phi 29$  es importante para una iniciación eficiente de la replicación del TP-DNA *in vitro*. La  $K_m$  de la DNA polimerasa por el nucleótido iniciador aumenta cuando utiliza como cebadores las TPs mutantes K27A y K25A/K27A, probablemente debido a un posicionamiento incorrecto del residuo iniciador Ser232 en el centro activo de la DNA polimerasa.

## Conclusiones

---

8. La proteína p6 del bacteriófago  $\phi 29$  contrarresta el defecto de iniciación de las TPs mutantes afectadas en unión a DNA.
9. El dominio N-terminal de la TP del bacteriófago  $\phi 29$  es necesario para una correcta interacción con la DNA polimerasa viral *in vitro*.
10. El dominio N-terminal de la TP del bacteriófago  $\phi 29$  es necesario para la amplificación del TP-DNA de  $\phi 29$  *in vitro*, probablemente debido a su implicación en la interacción entre la TP-iniciadora y la TP parental.



## Bibliografía

---



- Abril, A.M., Salas, M., Andreu, J.M., Hermoso, J.M. and Rivas, G. (1997) Phage  $\phi$ 29 protein p6 is in a monomer-dimer equilibrium that shifts to higher association states at the millimolar concentrations found *in vivo*. *Biochemistry*, **36**, 11901-11908.
- Ackermann, H.W. (1998) Tailed bacteriophages: the order *Caudovirales*. *Adv Virus Res*, **51**, 135-201.
- Alcorlo, M., González-Huici, V., Hermoso, J.M., Meijer, W.J. and Salas, M. (2007) The phage  $\phi$ 29 membrane protein p16.7, involved in DNA replication, is required for efficient ejection of the viral genome. *J Bacteriol*, **189**, 5542-5549.
- Anderson, D. L. and B. E. Reilly. (1993) Morphogenesis of bacteriophage  $\phi$ 29, In Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. and Losick, R. (eds). *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 859-867.
- Angeletti, P.C. and Engler, J.A. (1998) Adenovirus preterminal protein binds to the CAD enzyme at active sites of viral DNA replication on the nuclear matrix. *J Virol*, **72**, 2896-2904.
- Aylett, C.H., Izore, T., Amos, L.A. and Lowe, J. (2013) Structure of the tubulin/FtsZ-like protein TubZ from *Pseudomonas* bacteriophage fKZ. *J Mol Biol*, **425**, 2164-2173.
- Bakshi, S., Siryaporn, A., Goulian, M. and Weisshaar, J.C. (2012) Superresolution imaging of ribosomes and RNA polymerase in live *Escherichia coli* cells. *Mol Microbiol*, **85**, 21-38.
- Ballesteros-Plaza, D. (2014) Tesis doctoral. Estudio funcional de las proteínas p1 y p17 del bacteriófago  $\phi$ 29. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.
- Ballesteros-Plaza, D., Holguera, I., Scheffers, D.J., Salas, M. and Muñoz-Espín, D. (2013) Phage  $\phi$ 29 protein p1 promotes replication by associating with the FtsZ ring of the divisome in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 12313-12318.
- Barbosa, T.M., Serra, C.R., La Ragione, R.M., Woodward, M.J. and Henriques, A.O. (2005) Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 968-978.
- Barthelemy, I., Mellado, R.P. and Salas, M. (1989) *In vitro* transcription of bacteriophage  $\phi$ 29 DNA: inhibition of early promoters by the viral replication protein p6. *J Virol*, **63**, 460-462.

- Bath, C., Cukalac, T., Porter, K. and Dyall-Smith, M.L. (2006) His1 and His2 are distantly related, spindle-shaped haloviruses belonging to the novel virus group, Salterprovirus. *Virology*, **350**, 228-239.
- Beloin, C., Jeusset, J., Revet, B., Mirambeau, G., Le Hegarat, F. and Le Cam, E. (2003) Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA wrapping by the *Bacillus subtilis* LrpC protein. *J Biol Chem*, **278**, 5333-5342.
- Bendezú, F.O. and de Boer, P.A. (2008) Conditional lethality, division defects, membrane involution, and endocytosis in *mre* and *mrd* shape mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **190**, 1792-1811.
- Berlatzky, I.A., Rouvinski, A. and Ben-Yehuda, S. (2008) Spatial organization of a replicating bacterial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 14136-14140.
- Berman, A.J., Kamtekar, S., Goodman, J.L., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M. and Steitz, T.A. (2007) Structures of  $\phi 29$  DNA polymerase complexed with substrate: the mechanism of translocation in B-family polymerases. *EMBO J*, **26**, 3494-3505.
- Bernad, A., Blanco, L., Lázaro, J.M., Martin, G. and Salas, M. (1989) A conserved 3'-5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell*, **59**, 219-228.
- Biller, S.J. and Burkholder, W.F. (2009) The *Bacillus subtilis* SftA (YtpS) and SpoIIIE DNA translocases play distinct roles in growing cells to ensure faithful chromosome partitioning. *Mol Microbiol*, **74**, 790-809.
- Blanco, L. and Salas, M. (1984) Characterization and purification of a phage  $\phi 29$ -encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 5325-5329.
- Blanco, L. and Salas, M. (1985) Replication of phage  $\phi 29$  DNA with purified terminal protein and DNA polymerase: synthesis of full-length  $\phi 29$  DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 6404-6408.
- Blanco, L., Gutiérrez, J., Lázaro, J.M., Bernad, A. and Salas, M. (1986) Replication of phage  $\phi 29$  DNA *in vitro*: role of the viral protein p6 in initiation and elongation. *Nucleic Acids Res*, **14**, 4923-4937.
- Blanco, L., Bernad, A. and Salas, M. (1988) Transition from initiation to elongation in protein-primed  $\phi 29$  DNA replication: salt-dependent stimulation by the viral protein p6. *J Virol*, **62**, 4167-4172.

- Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J.M., Martin, G., Garmendia, C. and Salas, M. (1989) Highly efficient DNA synthesis by the phage  $\phi$ 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem*, **264**, 8935-8940.
- Blanco, L., Bernad, A., Esteban, J.A. and Salas, M. (1992) DNA-independent deoxynucleotidylation of the  $\phi$ 29 terminal protein by the  $\phi$ 29 DNA polymerase. *J Biol Chem*, **267**, 1225-1230.
- Blanco, L., Lázaro, J.M., de Vega, M., Bonnin, A. and Salas, M. (1994) Terminal protein-primed DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12198-12202.
- Blasco, M.A., Méndez, J., Lázaro, J.M., Blanco, L. and Salas, M. (1995) Primer terminus stabilization at the  $\phi$ 29 DNA polymerase active site. Mutational analysis of conserved motif KXY. *J Biol Chem*, **270**, 2735-2740.
- Bodnar, J.W., Hanson, P.I., Polvino-Bodnar, M., Zempsky, W. and Ward, D.C. (1989) The terminal regions of adenovirus and minute virus of mice DNAs are preferentially associated with the nuclear matrix in infected cells. *J Virol*, **63**, 4344-4353.
- Botting, C.H. and Hay, R.T. (2001) Role of conserved residues in the activity of adenovirus preterminal protein. *J Gen Virol*, **82**, 1917-1927.
- Bratton, B.P., Mooney, R.A. and Weisshaar, J.C. (2011) Spatial distribution and diffusive motion of RNA polymerase in live *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **193**, 5138-5146.
- Bravo, A., Hermoso, J.M. and Salas, M. (1994) A genetic approach to the identification of functional amino acids in protein p6 of *Bacillus subtilis* phage  $\phi$ 29. *Mol Gen Genet*, **245**, 529-536.
- Bravo, A. and Salas, M. (1997) Initiation of bacteriophage  $\phi$ 29 DNA replication *in vivo*: assembly of a membrane-associated multiprotein complex. *J Mol Biol*, **269**, 102-112.
- Bravo, A. and Salas, M. (1998) Polymerization of bacteriophage  $\phi$ 29 replication protein p1 into protofilament sheets. *EMBO J*, **17**, 6096-6105.
- Bravo, A., Illana, B. and Salas, M. (2000) Compartmentalization of phage  $\phi$ 29 DNA replication: interaction between the primer terminal protein and the membrane-associated protein p1. *EMBO J*, **19**, 5575-5584.

- Bridge, E. and Pettersson, U. (1995) Nuclear organization of replication and gene expression in adenovirus-infected cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, **199** ( Pt 1), 99-117.
- Britton, R.A., Lin, D.C. and Grossman, A.D. (1998) Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes Dev*, **12**, 1254-1259.
- Browning, D.F., Grainger, D.C. and Busby, S.J. (2010) Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Curr Opin Microbiol*, **13**, 773-780.
- Cabrera, J.E., Cagliero, C., Quan, S., Squires, C.L. and Jin, D.J. (2009) Active transcription of rRNA operons condenses the nucleoid in *Escherichia coli*: examining the effect of transcription on nucleoid structure in the absence of transesterification. *J Bacteriol*, **191**, 4180-4185.
- Calles, B., Salas, M. and Rojo, F. (2002) The  $\phi 29$  transcriptional regulator contacts the nucleoid protein p6 to organize a repression complex. *EMBO J*, **21**, 6185-6194.
- Camacho, A. and Salas, M. (2001a) Mechanism for the switch of  $\phi 29$  DNA early to late transcription by regulatory protein p4 and histone-like protein p6. *EMBO J*, **20**, 6060-6070.
- Camacho, A. and Salas, M. (2001b) Repression of bacteriophage  $\phi 29$  early promoter C2 by viral protein p6 is due to impairment of closed complex. *J Biol Chem*, **276**, 28927-28932.
- Camacho, A. and Salas, M. (2004) Molecular interplay between RNA polymerase and two transcriptional regulators in promoter switch. *J Mol Biol*, **336**, 357-368.
- Carballido-López, R., Formstone, A., Li, Y., Ehrlich, S.D., Noirot, P. and Errington, J. (2006a) Actin homolog MreBH governs cell morphogenesis by localization of the cell wall hydrolase LytE. *Dev Cell*, **11**, 399-409.
- Carballido-López, R. (2006b) The bacterial actin-like cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev*, **70**, 888-909.
- Carrascosa, J.L., Camacho, A., Moreno, F., Jiménez, F., Mellado, R.P., Viñuela, E. and Salas, M. (1976) *Bacillus subtilis* phage  $\phi 29$ . Characterization of gene products and functions. *Eur J Biochem*, **66**, 229-241.
- Castaing, J.P., Bouet, J.Y. and Lane, D. (2008) F plasmid partition depends on interaction of SopA with non-specific DNA. *Mol Microbiol*, **70**, 1000-1011.

- Castilla-Llorente, V., Muñoz-Espín, D., Villar, L., Salas, M. and Meijer, W.J. (2006) Spo0A, the key transcriptional regulator for entrance into sporulation, is an inhibitor of DNA replication. *EMBO J*, **25**, 3890-3899.
- Chaconas, G. and Chen, C.W. (2005) In Higgins, N. P. (ed.), *The Bacterial Chromosome*. American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 525-539.
- Chang, P.C. and Cohen, S.N. (1994) Bidirectional replication from an internal origin in a linear streptomyces plasmid. *Science*, **265**, 952-954.
- Chibazakura, T., Kawamura, F. and Takahashi, H. (1991) Differential regulation of *spo0A* transcription in *Bacillus subtilis*: glucose represses promoter switching at the initiation of sporulation. *J Bacteriol*, **173**, 2625-2632.
- Cokol, M., Nair, R. and Rost, B. (2000) Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep*, **1**, 411-415.
- Costes, A., Lecointe, F., McGovern, S., Quevillon-Cheruel, S. and Polard, P. (2010) The C-terminal domain of the bacterial SSB protein acts as a DNA maintenance hub at active chromosome replication forks. *PLoS Genet*, **6**, e1001238.
- Crucitti, P., Abril, A.M. and Salas, M. (2003) Bacteriophage  $\phi$ 29 early protein p17. Self-association and hetero-association with the viral histone-like protein p6. *J Biol Chem*, **278**, 4906-4911.
- David, A., Demarre, G., Muresan, L., Paly, E., Barre, F.X. and Possoz, C. (2014) The two Cis-acting sites, *parSI* and *oriCI*, contribute to the longitudinal organisation of *Vibrio cholerae* chromosome I. *PLoS Genet*, **10**, e1004448.
- de Jong, R.N. and van der Vliet, P.C. (1999) Mechanism of DNA replication in eukaryotic cells: cellular host factors stimulating adenovirus DNA replication. *Gene*, **236**, 1-12.
- de Jong, R.N., van der Vliet, P.C. and Brenkman, A.B. (2003) Adenovirus DNA replication: protein priming, jumping back and the role of the DNA binding protein DBP. *Curr Top Microbiol Immunol*, **272**, 187-211.
- de Vega, M., Lázaro, J.M., Salas, M. and Blanco, L. (1996) Primer-terminus stabilization at the 3'-5' exonuclease active site of  $\phi$ 29 DNA polymerase. Involvement of two amino acid residues highly conserved in proofreading DNA polymerases. *EMBO J*, **15**, 1182-1192.

- de Vega, M., Blanco, L. and Salas, M. (1998)  $\phi$ 29 DNA polymerase residue Ser122, a single-stranded DNA ligand for 3'-5' exonucleolysis, is required to interact with the terminal protein. *J Biol Chem*, **273**, 28966-28977.
- de Vega, M. and Salas, M. (2011) Protein primed replication of bacteriophage  $\phi$ 29 DNA. In Kusic-Tima, J. (ed.), *DNA Replication and Related Cellular Processes*, InTech, Rijeka, Croatia, pp. 179-206.
- de Vries, R. (2010) DNA condensation in bacteria: Interplay between macromolecular crowding and nucleoid proteins. *Biochimie*, **92**, 1715-1721.
- Daniel, R.A. and Errington, J. (2003) Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell*, **113**, 767-776.
- Deng, S., Stein, R.A. and Higgins, N.P. (2005) Organization of supercoil domains and their reorganization by transcription. *Mol Microbiol*, **57**, 1511-1521.
- Dervyn, E., Suski, C., Daniel, R., Bruand, C., Chapuis, J., Errington, J., Janniere, L. and Ehrlich, S.D. (2001) Two essential DNA polymerases at the bacterial replication fork. *Science*, **294**, 1716-1719.
- Dillon, S.C. and Dorman, C.J. (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol*, **8**, 185-195.
- Divakaruni, A.V., Baida, C., White, C.L. and Gober, J.W. (2007) The cell shape proteins MreB and MreC control cell morphogenesis by positioning cell wall synthetic complexes. *Mol Microbiol*, **66**, 174-188.
- Domínguez-Escobar, J., Chastanet, A., Crevenna, A.H., Fromion, V., Wedlich-Soldner, R. and Carballido-López, R. (2011) Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science*, **333**, 225-228.
- Dorman, C.J. and Deighan, P. (2003) Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr Opin Genet Dev*, **13**, 179-184.
- Dufour, E., Méndez, J., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L. and Salas, M. (2000) An aspartic acid residue in TPR-1, a specific region of protein-priming DNA polymerases, is required for the functional interaction with primer terminal protein. *J Mol Biol*, **304**, 289-300.



- Dufour, E., Rodríguez, I., Lázaro, J.M., de Vega, M. and Salas, M. (2003) A conserved insertion in protein-primed DNA polymerases is involved in primer terminus stabilisation. *J Mol Biol*, **331**, 781-794.
- Duggin, I.G., Andersen, P.A., Smith, M.T., Wilce, J.A., King, G.F. and Wake, R.G. (1999) Site-directed mutants of RTP of *Bacillus subtilis* and the mechanism of replication fork arrest. *J Mol Biol*, **286**, 1325-1335.
- Duggin, I.G. (2006) DNA replication fork arrest by the *Bacillus subtilis* RTP-DNA complex involves a mechanism that is independent of the affinity of RTP-DNA binding. *J Mol Biol*, **361**, 1-6.
- Dworkin, J. and Losick, R. (2002) Does RNA polymerase help drive chromosome segregation in bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14089-14094.
- Earl, A.M., Losick, R. and Kolter, R. (2008) Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol*, **16**, 269-275.
- Elías-Arnanz, M. and Salas, M. (1999) Functional interactions between a phage histone-like protein and a transcriptional factor in regulation of  $\phi$ 29 early-late transcriptional switch. *Genes Dev*, **13**, 2502-2513.
- Espeli, O. and Mariani, K.J. (2004) Untangling intracellular DNA topology. *Mol Microbiol*, **52**, 925-931.
- Fishov, I. and Norris, V. (2012) Membrane heterogeneity created by transertion is a global regulator in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, **15**, 724-730.
- Formstone, A. and Errington, J. (2005) A magnesium-dependent *mreB* null mutant: implications for the role of *mreB* in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **55**, 1646-1657.
- Fredman, J.N. and Engler, J.A. (1993) Adenovirus precursor to terminal protein interacts with the nuclear matrix *in vivo* and *in vitro*. *J Virol*, **67**, 3384-3395.
- Freire, R., Serrano, M., Salas, M. and Hermoso, J.M. (1996) Activation of replication origins in  $\phi$ 29-related phages requires the recognition of initiation proteins to specific nucleoprotein complexes. *J Biol Chem*, **271**, 31000-31007.

- Frick, D.N. and Richardson, C.C. (2001) DNA primases. *Annu Rev Biochem*, **70**, 39-80.
- Fricova, D., Valach, M., Farkas, Z., Pfeiffer, I., Kucsera, J., Tomaska, L. and Nosek, J. (2010) The mitochondrial genome of the pathogenic yeast *Candida subhashii*: GC-rich linear DNA with a protein covalently attached to the 5' termini. *Microbiology*, **156**, 2153-2163.
- Fukuoka, T., Moriya, S., Yoshikawa, H. and Ogasawara, N. (1990) Purification and characterization of an initiation protein for chromosomal replication, DnaA, in *Bacillus subtilis*. *J Biochem*, **107**, 732-739.
- Garmendia, C., Salas, M. and Hermoso, J.M. (1988) Site-directed mutagenesis in the DNA linking site of bacteriophage  $\phi$ 29 terminal protein: isolation and characterization of a Ser232-Thr mutant. *Nucleic Acids Res*, **16**, 5727-5740.
- Garmendia, C., Hermoso, J.M. and Salas, M. (1990) Functional domain for priming activity in the phage  $\phi$ 29 terminal protein. *Gene*, **88**, 73-79.
- Garner, E.C., Bernard, R., Wang, W., Zhuang, X., Rudner, D.Z. and Mitchison, T. (2011) Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis machinery and MreB filaments in *B. subtilis*. *Science*, **333**, 222-225.
- Gautam, A., Mulugu, S., Alexander, K. and Bastia, D. (2001) A single domain of the replication termination protein of *Bacillus subtilis* is involved in arresting both DnaB helicase and RNA polymerase. *J Biol Chem*, **276**, 23471-23479.
- Gella, P., Salas, M. and Mencía, M. (2014) Improved artificial origins for phage  $\phi$ 29 terminal protein-primed replication. Insights into early replication events. *Nucleic Acids Res*, **42**, 9792-9806.
- Gitai, Z., Dye, N. and Shapiro, L. (2004) An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8643-8648.
- Glaser, P., Danchin, A., Kunst, F., Zuber, P. and Nakano, M.M. (1995) Identification and isolation of a gene required for nitrate assimilation and anaerobic growth of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **177**, 1112-1115.
- Glaser, P., Sharpe, M.E., Raether, B., Perego, M., Ohlsen, K. and Errington, J. (1997) Dynamic, mitotic-like behavior of a bacterial protein required for accurate chromosome partitioning. *Genes Dev*, **11**, 1160-1168.

- González-Huici, V., Lázaro, J.M., Salas, M. and Hermoso, J.M. (2000) Specific recognition of parental terminal protein by DNA polymerase for initiation of protein-primed DNA replication. *J Biol Chem*, **275**, 14678-14683.
- González-Huici, V., Salas, M. and Hermoso, J.M. (2004a) The push-pull mechanism of bacteriophage  $\phi$ 29 DNA injection. *Mol Microbiol*, **52**, 529-540.
- González-Huici, V., Alcorlo, M., Salas, M. and Hermoso, J.M. (2004b) Binding of phage  $\phi$ 29 architectural protein p6 to the viral genome: evidence for topological restriction of the phage linear DNA. *Nucleic Acids Res*, **32**, 3493-3502.
- González-Huici, V., Alcorlo, M., Salas, M. and Hermoso, J.M. (2004c) Phage  $\phi$ 29 proteins p1 and p17 are required for efficient binding of architectural protein p6 to viral DNA *in vivo*. *J Bacteriol*, **186**, 8401-8406.
- González-Huici, V., Salas, M. and Hermoso, J.M. (2006) Requirements for *Bacillus subtilis* bacteriophage  $\phi$ 29 DNA ejection. *Gene*, **374**, 19-25.
- Graumann, P.L. (2001) SMC proteins in bacteria: condensation motors for chromosome segregation? *Biochimie*, **83**, 53-59.
- Griffiths, A.A., Andersen, P.A. and Wake, R.G. (1998) Replication terminator protein-based replication fork-arrest systems in various *Bacillus species*. *J Bacteriol*, **180**, 3360-3367.
- Grimes, S., Jardine, P.J. and Anderson, D. (2002) Bacteriophage  $\phi$ 29 DNA packaging. *Adv Virus Res*, **58**, 255-294.
- Gruber, S. and Errington, J. (2009) Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/SpoOJ promotes chromosome segregation in *B. subtilis*. *Cell*, **137**, 685-696.
- Gruber, S., Veening, J.W., Bach, J., Blettinger, M., Bramkamp, M. and Errington, J. (2014) Interlinked sister chromosomes arise in the absence of condensin during fast replication in *B. subtilis*. *Curr Biol*, **24**, 293-298.
- Gutiérrez, J., García, J.A., Blanco, L. and Salas, M. (1986) Cloning and template activity of the origins of replication of phage  $\phi$ 29 DNA. *Gene*, **43**, 1-11.

- Gutiérrez, J., Garmendia, C. and Salas, M. (1988) Characterization of the origins of replication of bacteriophage  $\phi$ 29 DNA. *Nucleic Acids Res*, **16**, 5895-5914.
- Gutiérrez, C., Sogo, J.M. and Salas, M. (1991) Analysis of replicative intermediates produced during bacteriophage  $\phi$ 29 DNA replication *in vitro*. *J Mol Biol*, **222**, 983-994.
- Gutiérrez, C., Freire, R., Salas, M. and Hermoso, J.M. (1994) Assembly of phage  $\phi$ 29 genome with viral protein p6 into a compact complex. *EMBO J*, **13**, 269-276.
- Harding, N.E. and Ito, J. (1980) DNA replication of bacteriophage  $\phi$ 29: characterization of the intermediates and location of the termini of replication. *Virology*, **104**, 323-338.
- Hermoso, J.M., Méndez, E., Soriano, F. and Salas, M. (1985) Location of the serine residue involved in the linkage between the terminal protein and the DNA of phage  $\phi$ 29. *Nucleic Acids Res*, **13**, 7715-7728.
- Hester, C.M. and Lutkenhaus, J. (2007) Soj (ParA) DNA binding is mediated by conserved arginines and is essential for plasmid segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 20326-20331.
- Higgins, D. and Dworkin, J. (2012) Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol Rev*, **36**, 131-148.
- Hirano, T. (2006) At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 311-322.
- Holmes, V.F. and Cozzarelli, N.R. (2000) Closing the ring: links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1322-1324.
- Huang, W.M., Libbey, J.L., van der Hoeven, P. and Yu, S.X. (1998) Bipolar localization of *Bacillus subtilis* topoisomerase IV, an enzyme required for chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4652-4657.
- Inciarte, M.R., Salas, M. and Sogo, J.M. (1980) Structure of replicating DNA molecules of *Bacillus subtilis* bacteriophage  $\phi$ 29. *J Virol*, **34**, 187-199.

- Ireton, K., Gunther, N.W.t. and Grossman, A.D. (1994) *spo0J* is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **176**, 5320-5329.
- Jin, D.J. and Cabrera, J.E. (2006) Coupling the distribution of RNA polymerase to global gene regulation and the dynamic structure of the bacterial nucleoid in *Escherichia coli*. *J Struct Biol*, **156**, 284-291.
- Jin, M., Chen, Y., Xu, C. and Zhang, X. (2014) The effect of inhibition of host MreB on the infection of thermophilic phage GVE2 in high temperature environment. *Sci Rep*, **4**, 4823.
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P. and Claverys, J.P. (2014) Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol*, **12**, 181-196.
- Jones, L.J., Carballido-López, R. and Errington, J. (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*, **104**, 913-922.
- Jun, S. and Wright, A. (2010) Entropy as the driver of chromosome segregation. *Nat Rev Microbiol*, **8**, 600-607.
- Kaimer, C., González-Pastor, J.E. and Graumann, P.L. (2009) SpoIIIE and a novel type of DNA translocase, SftA, couple chromosome segregation with cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **74**, 810-825.
- Kamtekar, S., Berman, A.J., Wang, J., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M. and Steitz, T.A. (2004) Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage  $\phi 29$ . *Mol Cell*, **16**, 609-618.
- Kamtekar, S., Berman, A.J., Wang, J., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M. and Steitz, T.A. (2006) The  $\phi 29$  DNA polymerase:protein-primer structure suggests a model for the initiation to elongation transition. *EMBO J*, **25**, 1335-1343.
- Kapitonov, V.V. and Jurka, J. (2006) Self-synthesizing DNA transposons in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 4540-4545.
- Karczmarek, A., Martínez-Arteaga, R., Alexeeva, S., Hansen, F.G., Vicente, M., Nanninga, N. and den Blaauwen, T. (2007) DNA and origin region segregation are not affected by the transition from rod to sphere after inhibition of *Escherichia coli* MreB by A22. *Mol Microbiol*, **65**, 51-63.

- Katayama, T., Ozaki, S., Keyamura, K. and Fujimitsu, K. (2010) Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and *oriC*. *Nat Rev Microbiol*, **8**, 163-170.
- Kelley, L.A. and Sternberg, M.J. (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc*, **4**, 363-371.
- Kelly, S.M., Jess, T.J. and Price, N.C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*, **1751**, 119-139.
- Kleckner, N., Fisher, J.K., Stouf, M., White, M.A., Bates, D. and Witz, G. (2014) The bacterial nucleoid: nature, dynamics and sister segregation. *Curr Opin Microbiol*, **22**, 127-137.
- Knipe, D.M., Lieberman, P.M., Jung, J.U., McBride, A.A., Morris, K.V., Ott, M., Margolis, D., Nieto, A., Nevels, M., Parks, R.J. *et al.* (2013) Snapshots: chromatin control of viral infection. *Virology*, **435**, 141-156.
- Kohler, P. and Marahiel, M.A. (1997) Association of the histone-like protein HBSu with the nucleoid of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **179**, 2060-2064.
- Kornberg, A. and Baker, T.A. (1992) *DNA replication*. 2nd edition. W.H. Freeman and Co., New York.
- Kraemer, J.A., Erb, M.L., Waddling, C.A., Montabana, E.A., Zehr, E.A., Wang, H., Nguyen, K., Pham, D.S., Agard, D.A. and Pogliano, J. (2012) A phage tubulin assembles dynamic filaments by an atypical mechanism to center viral DNA within the host cell. *Cell*, **149**, 1488-1499.
- Krause, M., Ruckert, B., Lurz, R. and Messer, W. (1997) Complexes at the replication origin of *Bacillus subtilis* with homologous and heterologous DnaA protein. *J Mol Biol*, **274**, 365-380.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S. *et al.* (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, **390**, 249-256.
- LaCasse, E.C. and Lefebvre, Y.A. (1995) Nuclear localization signals overlap DNA- or RNA-binding domains in nucleic acid-binding proteins. *Nucleic Acids Res*, **23**, 1647-1656.
- Lee, P.S. and Grossman, A.D. (2006) The chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) contribute to accurate chromosome partitioning, separation of replicated sister origins, and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **60**, 853-869.

- Lemon, K.P. and Grossman, A.D. (1998) Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science*, **282**, 1516-1519.
- Lemon, K.P., Moriya, S., Ogasawara, N., and Grossman, A.D. (2002) Chromosome replication and segregation. In *Bacillus subtilis and its Closest Relatives: from Genes to Cells*. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., and Losick, R., (eds). American Society for Microbiology Press, Washington, D.C. pp. 73–86.
- Leser, T.D., Knarreborg, A. and Worm, J. (2008) Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. *J Appl Microbiol*, **104**, 1025-1033.
- Lewis, P.J., Ralston, G.B., Christopherson, R.I. and Wake, R.G. (1990) Identification of the replication terminator protein binding sites in the terminus region of the *Bacillus subtilis* chromosome and stoichiometry of the binding. *J Mol Biol*, **214**, 73-84.
- Lewis, P.J., Thaker, S.D. and Errington, J. (2000) Compartmentalization of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *EMBO J*, **19**, 710-718.
- Libby, E.A., Roggiani, M. and Goulian, M. (2012) Membrane protein expression triggers chromosomal locus repositioning in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 7445-7450.
- Lindow, J.C., Britton, R.A. and Grossman, A.D. (2002a) Structural maintenance of chromosomes protein of *Bacillus subtilis* affects supercoiling *in vivo*. *J Bacteriol*, **184**, 5317-5322.
- Lindow, J.C., Kuwano, M., Moriya, S. and Grossman, A.D. (2002b) Subcellular localization of the *Bacillus subtilis* structural maintenance of chromosomes (SMC) protein. *Mol Microbiol*, **46**, 997-1009.
- Livny, J., Yamaichi, Y. and Waldor, M.K. (2007) Distribution of centromere-like *parS* sites in bacteria: insights from comparative genomics. *J Bacteriol*, **189**, 8693-8703.
- Luttinger, A. (1995) The twisted ‘life’ of DNA in the cell: bacterial topoisomerases. *Mol Microbiol*, **15**, 601-606.
- Manna, A.C., Pai, K.S., Bussiere, D.E., Davies, C., White, S.W. and Bastia, D. (1996) Helicase-contrahelicase interaction and the mechanism of termination of DNA replication. *Cell*, **87**, 881-891.

- Martin, G., Lázaro, J.M., Méndez, E. and Salas, M. (1989) Characterization of the phage  $\phi$ 29 protein p5 as a single-stranded DNA binding protein. Function in  $\phi$ 29 DNA-protein p3 replication. *Nucleic Acids Res*, **17**, 3663-3672.
- Mascarenhas, J., Soppa, J., Strunnikov, A.V. and Graumann, P.L. (2002) Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein. *EMBO J*, **21**, 3108-3118.
- Mathews, C.K. and Sinha, N.K. (1982) Are DNA precursors concentrated at replication sites? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 302-306.
- Matsumoto, Y., Hayashi, Y., Omori, H., Honda, T., Daito, T., Horie, M., Ikuta, K., Fujino, K., Nakamura, S., Schneider, U. *et al.* (2012) Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host Microbe*, **11**, 492-503.
- McBride, A.A. (2008) Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res*, **72**, 155-205.
- McBride, A.A., Sakakibara, N., Stepp, W.H. and Jang, M.K. (2012) Hitchhiking on host chromatin: how papillomaviruses persist. *Biochim Biophys Acta*, **1819**, 820-825.
- McDonell, M.W., Simon, M.N. and Studier, F.W. (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*, **110**, 119-146.
- Meijer, W.J., Lewis, P.J., Errington, J. and Salas, M. (2000) Dynamic relocation of phage  $\phi$ 29 DNA during replication and the role of the viral protein p16.7. *EMBO J*, **19**, 4182-4190.
- Meijer, W.J., Horcajadas, J.A. and Salas, M. (2001a)  $\phi$ 29 family of phages. *Microbiol Mol Biol Rev*, **65**, 261-287.
- Meijer, W.J., Serna-Rico, A. and Salas, M. (2001b) Characterization of the bacteriophage  $\phi$ 29-encoded protein p16.7: a membrane protein involved in phage DNA replication. *Mol Microbiol*, **39**, 731-746.
- Meijer, W.J., Castilla-Llorente, V., Villar, L., Murray, H., Errington, J. and Salas, M. (2005) Molecular basis for the exploitation of spore formation as survival mechanism by virulent phage  $\phi$ 29. *EMBO J*, **24**, 3647-3657.



- Meinhardt, F., Schaffrath, R. and Larsen, M. (1997) Microbial linear plasmids. *Appl Microbiol Biotechnol*, **47**, 329-336.
- Mencía, M., Gella, P., Camacho, A., de Vega, M. and Salas, M. (2011) Terminal protein-primed amplification of heterologous DNA with a minimal replication system based on phage  $\phi 29$ . *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 18655-18660.
- Méndez, J., Blanco, L., Esteban, J.A., Bernad, A. and Salas, M. (1992) Initiation of  $\phi 29$  DNA replication occurs at the second 3' nucleotide of the linear template: a sliding-back mechanism for protein-primed DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9579-9583.
- Méndez, J., Blanco, L., Lázaro, J.M. and Salas, M. (1994) Primer-terminus stabilization at the  $\phi 29$  DNA polymerase active site. Mutational analysis of conserved motif TX2GR. *J Biol Chem*, **269**, 30030-30038.
- Méndez, J., Blanco, L. and Salas, M. (1997) Protein-primed DNA replication: a transition between two modes of priming by a unique DNA polymerase. *EMBO J*, **16**, 2519-2527.
- Micka, B. and Marahiel, M.A. (1992) The DNA-binding protein HBSu is essential for normal growth and development in *Bacillus subtilis*. *Biochimie*, **74**, 641-650.
- Migocki, M.D., Lewis, P.J., Wake, R.G. and Harry, E.J. (2004) The midcell replication factory in *Bacillus subtilis* is highly mobile: implications for coordinating chromosome replication with other cell cycle events. *Mol Microbiol*, **54**, 452-463.
- Molina, F. and Skarstad, K. (2004) Replication fork and SeqA focus distributions in *Escherichia coli* suggest a replication hyperstructure dependent on nucleotide metabolism. *Mol Microbiol*, **52**, 1597-1612.
- Monsalve, M., Mencía, M., Rojo, F. and Salas, M. (1995) Transcription regulation in *Bacillus subtilis* phage  $\phi 29$ : expression of the viral promoters throughout the infection cycle. *Virology*, **207**, 23-31.
- Montero Llopis, P., Jackson, A.F., Sliusarenko, O., Surovtsev, I., Heinritz, J., Emonet, T. and Jacobs-Wagner, C. (2010) Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. *Nature*, **466**, 77-81.
- Moreno, F. and Bluzat-Moreno, F.G. (1978) Evidence that the neck appendages are adsorption organelles in *Bacillus subtilis* bacteriophage  $\phi 29$ . *J Virol*, **27**, 831-834.

- Moriya, S., Ogasawara, N. and Yoshikawa, H. (1985) Structure and function of the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. III. Nucleotide sequence of some 10,000 base pairs in the origin region. *Nucleic Acids Res*, **13**, 2251-2265.
- Moriya, S., Tsujikawa, E., Hassan, A.K., Asai, K., Kodama, T. and Ogasawara, N. (1998) A *Bacillus subtilis* gene-encoding protein homologous to eukaryotic SMC motor protein is necessary for chromosome partition. *Mol Microbiol*, **29**, 179-187.
- Mott, M.L. and Berger, J.M. (2007) DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, **5**, 343-354.
- Mul, Y.M. and van der Vliet, P.C. (1993) The adenovirus DNA binding protein effects the kinetics of DNA replication by a mechanism distinct from NFI or Oct-1. *Nucleic Acids Res*, **21**, 641-647.
- Muñoz-Espín, D. (2006) Tesis doctoral. Organization of phage  $\phi$ 29 DNA replication: role of protein p16.7. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.
- Muñoz-Espín, D., Daniel, R., Kawai, Y., Carballido-López, R., Castilla-Llorente, V., Errington, J., Meijer, W.J. and Salas, M. (2009) The actin-like MreB cytoskeleton organizes viral DNA replication in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 13347-13352.
- Mysiak, M.E., Holthuizen, P.E. and van der Vliet, P.C. (2004) The adenovirus priming protein pTP contributes to the kinetics of initiation of DNA replication. *Nucleic Acids Res*, **32**, 3913-3920.
- Nakano, M.M., Dailly, Y.P., Zuber, P. and Clark, D.P. (1997) Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J Bacteriol*, **179**, 6749-6755.
- Nasmyth, K. and Haering, C.H. (2005) The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem*, **74**, 595-648.
- Netherton, C.L. and Wileman, T. (2011) Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. *Curr Opin Virol*, **1**, 381-387.
- Nielsen, H.J., Ottesen, J.R., Youngren, B., Austin, S.J. and Hansen, F.G. (2006) The *Escherichia coli* chromosome is organized with the left and right chromosome arms in separate cell halves. *Mol Microbiol*, **62**, 331-338.

- Novoa, R.R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H. and Risco, C. (2005) Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell*, **97**, 147-172.
- Nuez, B., Rojo, F. and Salas, M. (1992) Phage  $\phi 29$  regulatory protein p4 stabilizes the binding of the RNA polymerase to the late promoter in a process involving direct protein-protein contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 11401-11405.
- Oliva, M.A., Martín-Galiano, A.J., Sakaguchi, Y. and Andreu, J.M. (2012) Tubulin homolog TubZ in a phage-encoded partition system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 7711-7716.
- Ortín, J., Viñuela, E., Salas, M. and Vázquez, C. (1971) DNA-protein complex in circular DNA from phage  $\phi 29$ . *Nat New Biol*, **234**, 275-277.
- Pastrana, R., Lázaro, J.M., Blanco, L., García, J.A., Méndez, E. and Salas, M. (1985) Overproduction and purification of protein p6 of *Bacillus subtilis* phage  $\phi 29$ : role in the initiation of DNA replication. *Nucleic Acids Res*, **13**, 3083-3100.
- Peng, X., Basta, T., Haring, M., Garrett, R.A. and Prangishvili, D. (2007) Genome of the Acidianus bottle-shaped virus and insights into the replication and packaging mechanisms. *Virology*, **364**, 237-243.
- Peñalva, M.A. and Salas, M. (1982) Initiation of phage  $\phi 29$  DNA replication *in vitro*: formation of a covalent complex between the terminal protein, p3, and 5'-dAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 5522-5526.
- Perczel, A., Hollosi, M., Tusnady, G. and Fasman, G.D. (1991) Convex constraint analysis: a natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins. *Protein Eng*, **4**, 669-679.
- Pérez-Arnaiz, P., Longás, E., Villar, L., Lázaro, J.M., Salas, M. and de Vega, M. (2007) Involvement of phage  $\phi 29$  DNA polymerase and terminal protein subdomains in conferring specificity during initiation of protein-primed DNA replication. *Nucleic Acids Res*, **35**, 7061-7073.
- Pérez-Lago, L., Serrano-Heras, G., Baños, B., Lázaro, J.M., Alcorlo, M., Villar, L. and Salas, M. (2011) Characterization of *Bacillus subtilis* uracil-DNA glycosylase and its inhibition by phage  $\phi 29$  protein p56. *Mol Microbiol*, **80**, 1657-1666.
- Peterson, C., Simon, M., Hodges, J., Mertens, P., Higgins, L., Egelman, E. and Anderson, D. (2001) Composition and mass of the bacteriophage  $\phi 29$  prohead and virion. *J Struct Biol*, **135**, 18-25.

- Postow, L., Hardy, C.D., Arsuaga, J. and Cozzarelli, N.R. (2004) Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev*, **18**, 1766-1779.
- Prieto, I., Serrano, M., Lázaro, J.M., Salas, M. and Hermoso, J.M. (1988) Interaction of the bacteriophage  $\phi$ 29 protein p6 with double-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 314-318.
- Radtke, K., Dohner, K. and Sodeik, B. (2006) Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol*, **8**, 387-400.
- Rahmouni, A.R. and Wells, R.D. (1992) Direct evidence for the effect of transcription on local DNA supercoiling *in vivo*. *J Mol Biol*, **223**, 131-144.
- Rasband, W.S. (1997–2011) ImageJ. [WWW document]. URL <http://imagej.nih.gov/ij/>. National Institutes of Health. Bethesda, MD.
- Redrejo-Rodríguez, M., Muñoz-Espín, D., Holguera, I., Mencía, M. and Salas, M. (2012) Functional eukaryotic nuclear localization signals are widespread in terminal proteins of bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 18482-18487.
- Redrejo-Rodríguez, M., Muñoz-Espín, D., Holguera, I., Mencía, M. and Salas, M. (2013) Nuclear and nucleoid localization are independently conserved functions in bacteriophage terminal proteins. *Mol Microbiol*, **90**, 858-868.
- Reilly, B.E. and Spizizen, J. (1965) Bacteriophage Deoxyribonucleate Infection of Competent *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **89**, 782-790.
- Reyes-Lamothe, R., Possoz, C., Danilova, O. and Sherratt, D.J. (2008) Independent positioning and action of *Escherichia coli* replisomes in live cells. *Cell*, **133**, 90-102.
- Robinow, C. and Kellenberger, E. (1994) The bacterial nucleoid revisited. *Microbiol Rev*, **58**, 211-232.
- Robinson, A. and van Oijen, A.M. (2013) Bacterial replication, transcription and translation: mechanistic insights from single-molecule biochemical studies. *Nat Rev Microbiol*, **11**, 303-315.

- Royo, F., Mencía, M., Monsalve, M. and Salas, M. (1998) Transcription activation and repression by interaction of a regulator with the  $\alpha$  subunit of RNA polymerase: the model of phage  $\phi$ 29 protein p4. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **60**, 29-46.
- Rokop, M.E., Auchtung, J.M. and Grossman, A.D. (2004) Control of DNA replication initiation by recruitment of an essential initiation protein to the membrane of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **52**, 1757-1767.
- Roy, A., Kucukural, A. and Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*, **5**, 725-738.
- Salas, M., Mellado, R.P. and Viñuela, E. (1978) Characterization of a protein covalently linked to the 5' termini of the DNA of *Bacillus subtilis* phage  $\phi$ 29. *J Mol Biol*, **119**, 269-291.
- Salas, M. (1991) Protein-priming of DNA replication. *Annu Rev Biochem*, **60**, 39-71.
- Salas, M. (1999) Mechanisms of initiation of linear DNA replication in prokaryotes. *Genet Eng (N Y)*, **21**, 159-171.
- Salas, M. and de Vega, M. (2008) In Mahy, B. W. J. and van Regenmortel, M. H. V. (eds.), *Encyclopedia of Virology, 3rd edition*. Elsevier, Oxford, Vol. **4**, pp. 339-406.
- Salje, J. (2010) Plasmid segregation: how to survive as an extra piece of DNA. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **45**, 296-317.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez-Romero, M.A., Molina, F. and Jiménez-Sánchez, A. (2010) Correlation between ribonucleoside-diphosphate reductase and three replication proteins in *Escherichia coli*. *BMC Mol Biol*, **11**, 11.
- Sanders, G.M., Dallmann, H.G. and McHenry, C.S. (2010) Reconstitution of the *B. subtilis* replisome with 13 proteins including two distinct replicases. *Mol Cell*, **37**, 273-281.

- Santos, E., Lázaro, J.M., Pérez-Arnaiz, P., Salas, M. and de Vega, M. (2014) Role of the LEXE motif of protein-primed DNA polymerases in the interaction with the incoming nucleotide. *J Biol Chem*, **289**, 2888-2898.
- Schaack, J., Ho, W.Y., Freimuth, P. and Shenk, T. (1990) Adenovirus terminal protein mediates both nuclear matrix association and efficient transcription of adenovirus DNA. *Genes Dev*, **4**, 1197-1208.
- Schirner, K. and Errington, J. (2009) The cell wall regulator  $\sigma$ I specifically suppresses the lethal phenotype of *mbl* mutants in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **191**, 1404-1413.
- Schmidt, T.G. and Skerra, A. (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc*, **2**, 1528-1535.
- Schwartz, C. and Guo, P. (2013) Ultrastable pRNA hexameric ring gearing hexameric  $\phi$ 29 DNA-packaging motor by revolving without rotating and coiling. *Curr Opin Biotechnol*, **24**, 581-590.
- Sciochetti, S.A. and Piggot, P.J. (2000) A tale of two genomes: resolution of dimeric chromosomes in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol*, **151**, 503-511.
- Serna-Rico, A., Salas, M. and Meijer, W.J. (2002) The *Bacillus subtilis* phage  $\phi$ 29 protein p16.7, involved in  $\phi$ 29 DNA replication, is a membrane-localized single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem*, **277**, 6733-6742.
- Serna-Rico, A., Muñoz-Espín, D., Villar, L., Salas, M. and Meijer, W.J. (2003) The integral membrane protein p16.7 organizes *in vivo*  $\phi$ 29 DNA replication through interaction with both the terminal protein and ssDNA. *EMBO J*, **22**, 2297-2306.
- Serrano-Heras, G., Bravo, A. and Salas, M. (2008) Phage  $\phi$ 29 protein p56 prevents viral DNA replication impairment caused by uracil excision activity of uracil-DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 19044-19049.
- Serrano, M., Salas, M. and Hermoso, J.M. (1990) A novel nucleoprotein complex at a replication origin. *Science*, **248**, 1012-1016.
- Serrano, M., Gutiérrez, C., Salas, M. and Hermoso, J.M. (1993) Superhelical path of the DNA in the nucleoprotein complex that activates the initiation of phage  $\phi$ 29 DNA replication. *J Mol Biol*, **230**, 248-259.

- Serrano, M., Gutiérrez, C., Freire, R., Bravo, A., Salas, M. and Hermoso, J.M. (1994) Phage  $\phi$ 29 protein p6: a viral histone-like protein. *Biochimie*, **76**, 981-991.
- Shaevitz, J.W. and Gitai, Z. (2010) The structure and function of bacterial actin homologs. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**, a000364.
- Sharpe, M.E. and Errington, J. (1995) Postseptational chromosome partitioning in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8630-8634.
- Shebelut, C.W., Jensen, R.B. and Gitai, Z. (2009) Growth conditions regulate the requirements for *Caulobacter* chromosome segregation. *J Bacteriol*, **191**, 1097-1100.
- Siala, A., Hill, I.R. and Gray, T.R.G. (1974) Populations of Spore-forming Bacteria in an Acid Forest Soil, with Special Reference to *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol*, **81**, 183-190.
- Sievers, J., Raether, B., Perego, M. and Errington, J. (2002) Characterization of the parB-like *yyaA* gene of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **184**, 1102-1111.
- Sinden, R.R. and Pettijohn, D.E. (1981) Chromosomes in living *Escherichia coli* cells are segregated into domains of supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 224-228.
- Smith, D.E., Tans, S.J., Smith, S.B., Grimes, S., Anderson, D.L. and Bustamante, C. (2001) The bacteriophage straight  $\phi$ 29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature*, **413**, 748-752.
- Smith, M.T. and Wake, R.G. (1992) Definition and polarity of action of DNA replication terminators in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol*, **227**, 648-657.
- Soberón, N.E., Lioy, V.S., Pratto, F., Volante, A. and Alonso, J.C. (2011) Molecular anatomy of the *Streptococcus pyogenes* pSM19035 partition and segrosome complexes. *Nucleic Acids Res*, **39**, 2624-2637.
- Soengas, M.S., Gutiérrez, C. and Salas, M. (1995) Helix-destabilizing activity of  $\phi$ 29 single-stranded DNA binding protein: effect on the elongation rate during strand displacement DNA replication. *J Mol Biol*, **253**, 517-529.

- Sogo, J.M., Inciarte, M.R., Corral, J., Viñuela, E. and Salas, M. (1979) RNA polymerase binding sites and transcription map of the DNA of *Bacillus subtilis* phage  $\phi$ 29. *J Mol Biol*, **127**, 411-436.
- Sogo, J.M., García, J.A., Peñalva, M.A. and Salas, M. (1982) Structure of protein-containing replicative intermediates of *Bacillus subtilis* phage  $\phi$ 29 DNA. *Virology*, **116**, 1-18.
- Soppa, J., Kobayashi, K., Noirot-Gros, M.F., Oesterhelt, D., Ehrlich, S.D., Dervyn, E., Ogasawara, N. and Moriya, S. (2002) Discovery of two novel families of proteins that are proposed to interact with prokaryotic SMC proteins, and characterization of the *Bacillus subtilis* family members ScpA and ScpB. *Mol Microbiol*, **45**, 59-71.
- Soufo, H.J. and Graumann, P.L. (2003) Actin-like proteins MreB and Mbl from *Bacillus subtilis* are required for bipolar positioning of replication origins. *Curr Biol*, **13**, 1916-1920.
- Stein, R.A., Deng, S. and Higgins, N.P. (2005) Measuring chromosome dynamics on different time scales using resolvases with varying half-lives. *Mol Microbiol*, **56**, 1049-1061.
- Steiner, M., Lubitz, W. and Blasi, U. (1993) The missing link in phage lysis of gram-positive bacteria: gene 14 of *Bacillus subtilis* phage  $\phi$ 29 encodes the functional homolog of lambda S protein. *J Bacteriol*, **175**, 1038-1042.
- Studier, F.W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*, **41**, 207-234.
- Sueoka, N. and Hammers, J.M. (1974) Isolation of DNA-membrane complex in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 4787-4791.
- Sueoka, N. (1998) Cell membrane and chromosome replication in *Bacillus subtilis*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **59**, 35-53.
- Sullivan, N.L., Marquis, K.A. and Rudner, D.Z. (2009) Recruitment of SMC by ParB-parS organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation. *Cell*, **137**, 697-707.
- Talavera, A., Salas, M. and Viñuela, E. (1972) Temperature-sensitive mutants affected in DNA synthesis in phage  $\phi$ 29 of *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem*, **31**, 367-371.



- Tam, N.K., Uyen, N.Q., Hong, H.A., Duc le, H., Hoa, T.T., Serra, C.R., Henriques, A.O. and Cutting, S.M. (2006) The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J Bacteriol*, **188**, 2692-2700.
- Tan, I.S. and Ramamurthi, K.S. (2014) Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol Rep*, **6**, 212-225.
- Teleman, A.A., Graumann, P.L., Lin, D.C., Grossman, A.D. and Losick, R. (1998) Chromosome arrangement within a bacterium. *Curr Biol*, **8**, 1102-1109.
- Tiyanont, K., Doan, T., Lazarus, M.B., Fang, X., Rudner, D.Z. and Walker, S. (2006) Imaging peptidoglycan biosynthesis in *Bacillus subtilis* with fluorescent antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11033-11038.
- Trun, N.J. and Marko, J.F. (1998) Architecture of bacterial chromosome. *ASM News*, **64**, 276-283.
- Truniger, V., Lázaro, J.M., Salas, M. and Blanco, L. (1998)  $\phi$ 29 DNA polymerase requires the N-terminal domain to bind terminal protein and DNA primer substrates. *J Mol Biol*, **278**, 741-755.
- Truniger, V., Blanco, L. and Salas, M. (1999) Role of the “YxGG/A” motif of  $\phi$ 29 DNA polymerase in protein-primed replication. *J Mol Biol*, **286**, 57-69.
- Truniger, V., Lázaro, J.M., Esteban, F.J., Blanco, L. and Salas, M. (2002a) A positively charged residue of  $\phi$ 29 DNA polymerase, highly conserved in DNA polymerases from families A and B, is involved in binding the incoming nucleotide. *Nucleic Acids Res*, **30**, 1483-1492.
- Truniger, V., Lázaro, J.M., Blanco, L. and Salas, M. (2002b) A highly conserved lysine residue in  $\phi$ 29 DNA polymerase is important for correct binding of the templating nucleotide during initiation of  $\phi$ 29 DNA replication. *J Mol Biol*, **318**, 83-96.
- Truniger, V., Lázaro, J.M. and Salas, M. (2004) Two positively charged residues of  $\phi$ 29 DNA polymerase, conserved in protein-primed DNA polymerases, are involved in stabilisation of the incoming nucleotide. *J Mol Biol*, **335**, 481-494.
- Vallet-Gely, I. and Boccard, F. (2013) Chromosomal organization and segregation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet*, **9**, e1003492.

- van Dijl, J.M. and Hecker, M. (2013) *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microb Cell Fact*, **12**, 3.
- Vecchiarelli, A.G., Mizuuchi, K. and Funnell, B.E. (2012) Surfing biological surfaces: exploiting the nucleoid for partition and transport in bacteria. *Mol Microbiol*, **86**, 513-523.
- Velten, M., McGovern, S., Marsin, S., Ehrlich, S.D., Noirot, P. and Polard, P. (2003) A two-protein strategy for the functional loading of a cellular replicative DNA helicase. *Mol Cell*, **11**, 1009-1020.
- Verdun, R.E. and Karlseder, J. (2007) Replication and protection of telomeres. *Nature*, **447**, 924-931.
- Villanueva, N. and Salas, M. (1981) Adsorption of bacteriophage  $\phi 29$  to *Bacillus subtilis* through the neck appendages of the viral particle. *J Virol*, **38**, 15-19.
- Viollier, P.H., Thanbichler, M., McGrath, P.T., West, L., Meewan, M., McAdams, H.H. and Shapiro, L. (2004) Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9257-9262.
- Vivian, J.P., Porter, C.J., Wilce, J.A. and Wilce, M.C. (2007) An asymmetric structure of the *Bacillus subtilis* replication terminator protein in complex with DNA. *J Mol Biol*, **370**, 481-491.
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugard, P., Losick, R. and Kolter, R. (2013) Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol*, **11**, 157-168.
- Volkov, A., Mascarenhas, J., Andrei-Selmer, C., Ulrich, H.D. and Graumann, P.L. (2003) A prokaryotic condensin/cohesin-like complex can actively compact chromosomes from a single position on the nucleoid and binds to DNA as a ring-like structure. *Mol Cell Biol*, **23**, 5638-5650.
- Wang, X., Montero Llopis, P. and Rudner, D.Z. (2013) Organization and segregation of bacterial chromosomes. *Nat Rev Genet*, **14**, 191-203.
- Wang, X. and Rudner, D.Z. (2014) Spatial organization of bacterial chromosomes. *Curr Opin Microbiol*, **22**, 66-72.

- Wang, X., Montero Llopis, P. and Rudner, D.Z. (2014a) *Bacillus subtilis* chromosome organization oscillates between two distinct patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 12877-12882.
- Wang, X., Tang, O.W., Riley, E.P. and Rudner, D.Z. (2014b) The SMC condensin complex is required for origin segregation in *Bacillus subtilis*. *Curr Biol*, **24**, 287-292.
- Webb, C.D., Teleman, A., Gordon, S., Straight, A., Belmont, A., Lin, D.C., Grossman, A.D., Wright, A. and Losick, R. (1997) Bipolar localization of the replication origin regions of chromosomes in vegetative and sporulating cells of *B. subtilis*. *Cell*, **88**, 667-674.
- Webb, C.D., Graumann, P.L., Kahana, J.A., Teleman, A.A., Silver, P.A. and Losick, R. (1998) Use of time-lapse microscopy to visualize rapid movement of the replication origin region of the chromosome during the cell cycle in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **28**, 883-892.
- White, C.L. and Gober, J.W. (2012) MreB: pilot or passenger of cell wall synthesis? *Trends Microbiol*, **20**, 74-79.
- Whiteley, H.R., Ramey, W.D., Spiegelman, G.B. and Holder, R.D. (1986) Modulation of *in vivo* and *in vitro* transcription of bacteriophage  $\phi$ 29 early genes. *Virology*, **155**, 392-401.
- Winston, S. and Sueoka, N. (1980) DNA-membrane association is necessary for initiation of chromosomal and plasmid replication in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 2834-2838.
- Woldringh, C.L. (2002) The role of co-transcriptional translation and protein translocation (transertion) in bacterial chromosome segregation. *Mol Microbiol*, **45**, 17-29.
- Woldringh, C.L. and Nanninga, N. (2006) Structural and physical aspects of bacterial chromosome segregation. *J Struct Biol*, **156**, 273-283.
- Wu, H.Y., Shyy, S.H., Wang, J.C. and Liu, L.F. (1988) Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell*, **53**, 433-440.
- Wu, L.J. and Errington, J. (2004) Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell*, **117**, 915-925.

- Wu, L.J., Ishikawa, S., Kawai, Y., Oshima, T., Ogasawara, N. and Errington, J. (2009) Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *EMBO J*, **28**, 1940-1952.
- Wu, L.J. and Errington, J. (2011) Nucleoid occlusion and bacterial cell division. *Nat Rev Microbiol*, **10**, 8-12.
- Xiang, Y., Morais, M.C., Cohen, D.N., Bowman, V.D., Anderson, D.L. and Rossmann, M.G. (2008) Crystal and cryoEM structural studies of a cell wall degrading enzyme in the bacteriophage  $\phi$ 29 tail. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 9552-9557.
- Xiang, Y., Leiman, P.G., Li, L., Grimes, S., Anderson, D.L. and Rossmann, M.G. (2009) Crystallographic insights into the autocatalytic assembly mechanism of a bacteriophage tail spike. *Mol Cell*, **34**, 375-386.
- Yamaguchi, K. and Yoshikawa, H. (1977) Chromosome-Membrane association in *Bacillus subtilis*. III. Isolation and characterization of a DNA-protein complex carrying replication origin markers. *J Mol Biol*, **110**, 219-253.
- Yamashita, S., Kawamura, F., Yoshikawa, H., Takahashi, H., Kobayashi, Y. and Saito, H. (1989) Dissection of the expression signals of the *spoA* gene of *Bacillus subtilis*: glucose represses sporulation-specific expression. *J Gen Microbiol*, **135**, 1335-1345.
- Yoshikawa, H. and Sueoka, N. (1963a) Sequential replication of *Bacillus subtilis* chromosome. I. Comparison of marker frequencies in exponential and stationary growth phases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **49**, 559-566.
- Yoshikawa, H. and Sueoka, N. (1963b) Sequential replication of the *Bacillus subtilis* chromosome. II. Isotopic transfer experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **49**, 806-813.
- Young, F.E. (1967) Requirement of glucosylated teichoic acid for adsorption of phage in *Bacillus subtilis* 168. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **58**, 2377-2384.
- Zaballos, A. and Salas, M. (1989) Functional domains in the bacteriophage  $\phi$ 29 terminal protein for interaction with the  $\phi$ 29 DNA polymerase and with DNA. *Nucleic Acids Res*, **17**, 10353-10366.

Zhang, W., Carneiro, M.J., Turner, I.J., Allen, S., Roberts, C.J. and Soultanas, P. (2005) The *Bacillus subtilis* DnaD and DnaB proteins exhibit different DNA remodelling activities. *J Mol Biol*, **351**, 66-75.

Zhang, Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, **9**, 40.

Zhao, L.J. and Padmanabhan, R. (1988) Nuclear transport of adenovirus DNA polymerase is facilitated by interaction with preterminal protein. *Cell*, **55**, 1005-1015.

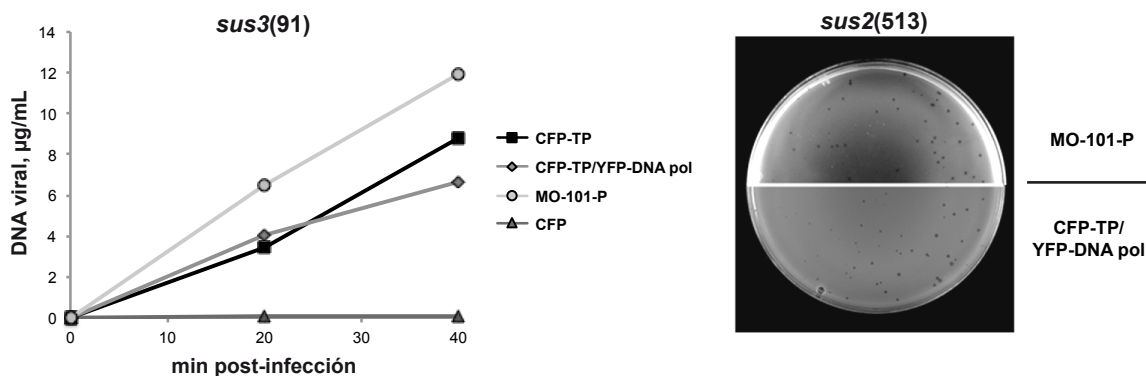
Zhou, H.X., Rivas, G. and Minton, A.P. (2008) Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annu Rev Biophys*, **37**, 375-397.



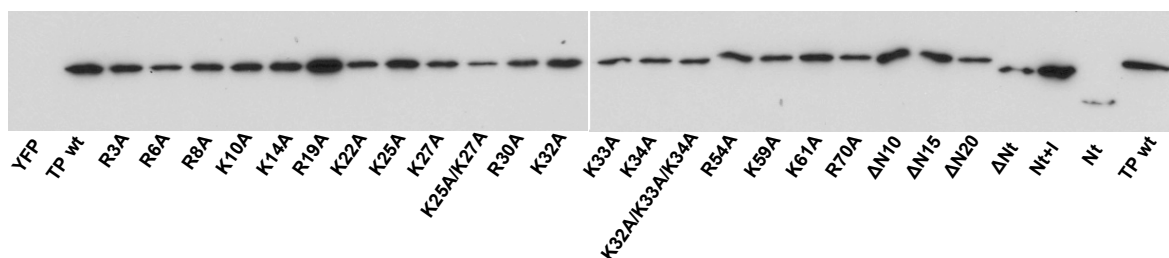
# Material Suplementario



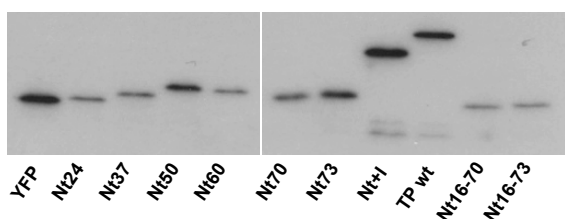




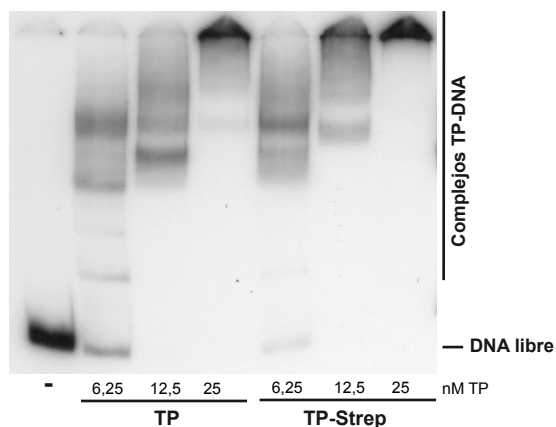
**Figura S1. Funcionalidad de las proteínas de fusión CFP-TP y YFP-DNA pol.** Panel izquierdo: Experimentos de complementación de la infección con el fago mutante *sus3(91)* utilizando la estirpe de *B. subtilis* su<sup>-</sup> que expresa simultáneamente las proteínas de fusión CFP-TP y YFP-DNA pol (DM-023). Como control negativo del experimento se utilizó la estirpe de *B. subtilis* que expresa la CFP (DM-024), y como controles positivos la estirpe que expresa CFP-TP (DM-025) y la estirpe supresora MO-101-P. La expresión de la CFP se indujo añadiendo 1 mM IPTG (concentración final) al medio y la expresión de CFP-TP y YFP-DNA pol se indujo añadiendo simultáneamente 1 mM IPTG (concentración final) y 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final) al medio en el momento de la infección con el fago mutante *sus3(91)* a una MOI de 5. La cantidad de DNA viral acumulado (µg DNA viral/mL de cultivo) en cada estirpe se representa en función del tiempo post-infección. Panel derecho: Las estirpes de *B. subtilis* DM-023 y MO-101-P se crecieron en medio LB hasta DO<sub>600</sub> ~0,4 y se infectaron con el fago mutante *sus2(513)* a una MOI de 5. A los 40 min post-infección los cultivos se mezclaron con top agar líquido que contenía 0,5% (p/v) xilosa y se extendieron en placas de LB-agar, incubándose a 37 °C durante toda la noche. Se muestra la formación de placas de lisis en ambas estirpes.



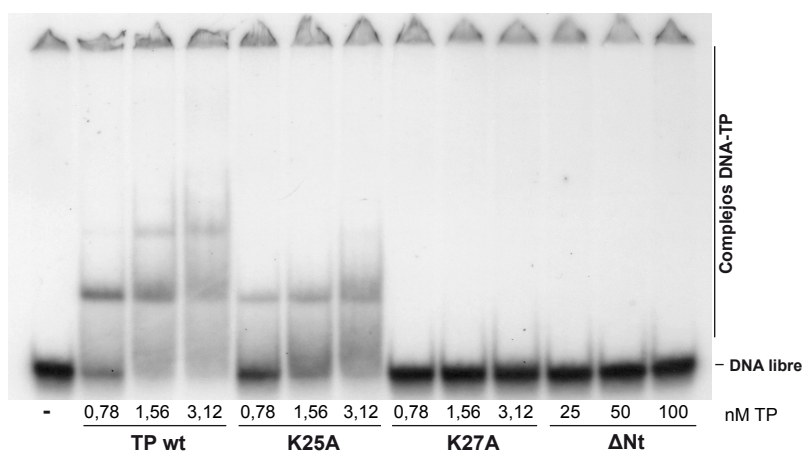
**Figura S2. Expresión de la proteína YFP-TP wild-type y las TPs mutantes en el dominio N-terminal fusionadas a YFP.** Las estirpes de *B. subtilis* que expresaban las proteínas de fusión indicadas se crecieron a 37 °C en medio LB hasta DO<sub>600</sub> de ~0,4, momento en el que se añadió al medio 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final). Las muestras fueron tomadas 30 min tras la adición del inductor y analizadas por Western Blot utilizando anticuerpos policlonales específicos contra la TP.



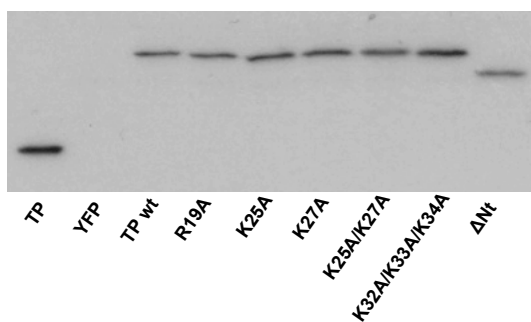
**Figura S3. Expresión de la proteína YFP-TP wild-type y de los fragmentos del dominio N-terminal de la TP fusionados a YFP.** Las estirpes de *B. subtilis* que expresaban las proteínas de fusión indicadas se crecieron a 37 °C en medio LB hasta DO<sub>600</sub> de ~0,4, momento en el que se añadió al medio 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final). Las muestras fueron tomadas 30 min tras la adición del inductor y analizadas por Western Blot utilizando anticuerpos contra la GFP.



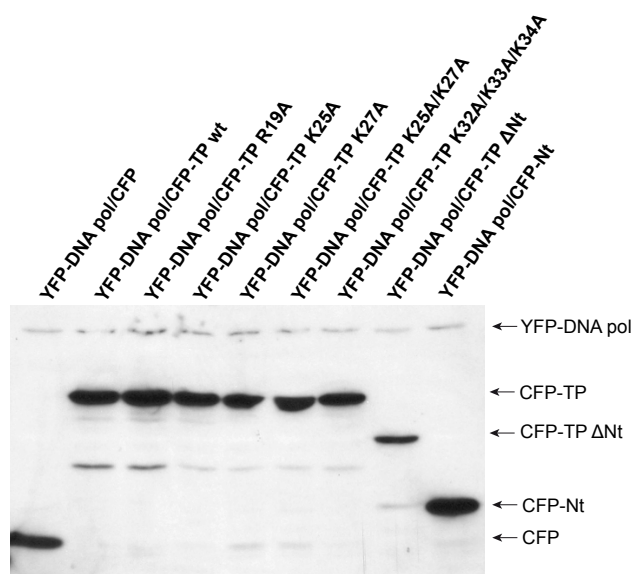
**Figura S4. Análisis de la unión a dsDNA de la TP *wild-type* de  $\phi 29$  con y sin *Strep-tag*.** Ensayos de retraso en gel utilizando 1 nM de un sustrato de dsDNA de 216 pb marcado en 5' con [ $\gamma^{32}$ P]ATP, correspondiente al gen *yshC* de *B. subtilis*. El sustrato marcado se incubó en ausencia (-) o en presencia de concentraciones crecientes de la proteína indicada en cada caso. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% en condiciones nativas, tras lo cual se detectó la movilidad de los diferentes complejos TP-dsDNA mediante autorradiografía.



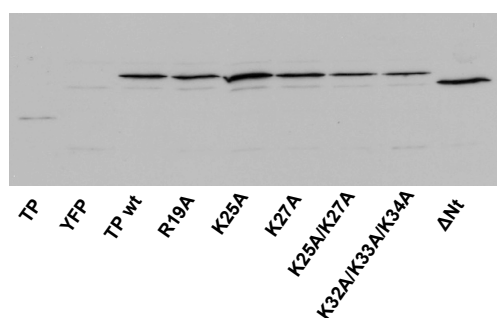
**Figura S5. Análisis de la unión a ssDNA de la TP *wild-type* de  $\phi 29$ , el mutante de delección  $\Delta Nt$  y los mutantes puntuales K25A y K27A.** Ensayos de retraso en gel utilizando 1 nM de un oligonucleótido de ssDNA marcado en 5' con [ $\gamma^{32}$ P]ATP de 68-mer ( $\phi R68-T$ ) correspondiente al extremo derecho del genoma de  $\phi 29$ . El sustrato marcado se incubó en ausencia (-) o en presencia de concentraciones crecientes de la proteína indicada en cada caso. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% en condiciones nativas, tras lo cual se detectó la movilidad de los diferentes complejos TP-ssDNA mediante autorradiografía.



**Figura S6. Expresión de la proteína YFP-TP *wild-type* y las TPs mutantes en el dominio N-terminal fusionadas a YFP en las condiciones utilizadas en los experimentos de X-ChiP.** Las estirpes de *B. subtilis* que expresan las proteínas de fusión indicadas se crecieron a 30 °C en medio LB. A  $DO_{600} \sim 0,4$  se añadió al medio 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final). Una h después de la adición del inductor se tomaron muestras de cada cultivo y se analizó la expresión de las proteínas por *Western Blot*, utilizando anticuerpos específicos contra la TP. Como control, se cargaron 32 ng de la TP *wild-type* purificada.



**Figura S7. Co-expresión de la TP *wild-type* o de los mutantes de la TP en el dominio N-terminal fusionados a CFP y de la DNA polimerasa fusionada a YFP.** Las estirpes de *B. subtilis* que co-expresan las proteínas indicadas se crecieron a 37 °C en medio LB hasta  $DO_{600}$  de ~0,4, momento en el que se añadió al medio tanto 1 mM IPTG (concentración final) como 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final). Treinta minutos tras la adición de los inductores se tomaron muestras de cada cultivo y se analizó la expresión de las proteínas por *Western Blot*, utilizando anticuerpos contra la GFP. La estirpe de *B. subtilis* que expresa la CFP y la YFP-DNA pol se utilizó como control.



**Figura S8. Expresión de la proteína YFP-TP *wild-type* y las TPs mutantes en el dominio N-terminal fusionadas a YFP en las condiciones utilizadas en los experimentos de complementación con el fago mutante *sus3(91)*.** Las estirpes de *B. subtilis*  $su^-$  que expresan las proteínas de fusión indicadas se crecieron a 37 °C en medio LB hasta  $DO_{600}$  ~0,4, momento en el que fueron infectadas con el fago mutante *sus3(91)* a una MOI de 1 y se añadió al medio 0,5 % (p/v) xilosa (concentración final). Se tomaron muestras 20 min después de la infección y la inducción y se analizó la expresión de las proteínas por *Western Blot* utilizando anticuerpos específicos contra la TP. La estirpe de *B. subtilis*  $su^-$  que expresa la YFP sola se utilizó como control. Se cargaron 10 ng de la TP *wild-type* purificada como control.

Tabla MS1. Oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótido	Secuencia
YFP-TP_U	(5'-gat aac tcg aga tgg cga gaa gtc cac gta tac gc-3')
YFP-TP_L	(5'-ttt aag aat tcc tag aac ccc ttt aag ctt aga tca aag tc-3')
CFP(Bs)_U	(5'-cgt gat taa aag ctt aca taa gga gga ac-3')
CFP(Bs)_L	(5'-tta agg agc tag cct tat aaa gtt cgt cca tgc caa gtg taa tgc-3')
150-SpeI-1	(5'-gca agc taa ttc ggt gga aac tag ttc atc att tcc ttc cga aaa aac gg-3')
150-SpeI-2	(5'-ccg ttt ttt cgg aag gaa atg atg aac tag ttt cca ccg aat tag ctt gc-3')
TP_U	(5'-gat aag cat gca tgg cga gaa gtc cac gta t-3')
TP_L	(5'-ttt aaa cta gtc tag aac ccc ttt aag ctt a-3')
TP-Nt_L	(5'-ttt tca cta gtt tat cac ata tta gca cgg tta gtg aaa gag g-3')
TP-Ntl_L	(5'-ttc tta cta gtt tac taa ggg tct gtt ctc atc tcc atg c-3')
TP-I_U	(5'-taa ccg cat gca tat gcg tta tca gtt cga aaa g-3')
TP-Ct_U	(5'-gag aag cat gcc tca gta tta tga aaa gaa aat gat aca g-3')
TP8_R	(5'-cgg aag gca tgc tca tgg cga aga aaa aac cag tag aa-3')
TP8_L	(5'-acg gcg act agt tca tta aac ccc ctt gct gcc ata gcc gcg-3')
TP-R3A-R	(5'-ccc ctc gag atg gcg gca agt cca cgt ata cg-3')
TP-R3A-L	(5'-cgt ata cgt gga ctt gcc gcc atc tcg agg gg-3')
TP-R6A-R	(5'-atg gcg aga agt cca gct ata cgc att aag ga-3')
TP-R6A-L	(5'-tcc tta atg cgt ata gct gga ctt ctc gcc at-3')
TP-R8A-R	(5'-aga agt cca cgt ata gcc att aag gat aat ga-3')
TP-R8A-L	(5'-tca tta tcc tta atg gct ata cgt gga ctt ct-3')
TP-K10A-R	(5'-cca cgt ata cgc att gcg gat aat gac aaa gc-3')
TP-K10A-L	(5'-gct ttg tca tta tcc gca atg cgt ata cgt gg-3')
TP-K14A-R	(5'-att aag gat aat gac gca gcc gaa tac gct cg-3')
TP-K14A-L	(5'-cga gcg tat tcg gct gcg tca tta tcc tta at-3')
TP-R19A-R	(5'-aaa gcc gaa tac gct gca ttg gtc aag aat ac-3')
TP-R19A-L	(5'-gta ttc ttg acc aat gca gcg tat tcg gct tt-3')
TP-K22A-R	(5'-tac gct cga ttg gtc gcg aat aca aaa gcc aa-3')
TP-K22A-L	(5'-ttg gct ttt gta ttc gcg acc aat cga gcg ta-3')
TP-K25A-R	(5'-ttg gtc aag aat aca gca gcc aag att gcg ag-3')
TP-K25A-L	(5'-ctc gca atc ttg gct gct gta ttc ttg acc aa-3')
TP-K27A-R	(5'-aag aat aca aaa gcc gcg att gcg aga acg aa-3')
TP-K27A-L	(5'-ttc gtt ctc gca atc gcg gct ttt gta ttc tt-3')
TP-K25A/K27A-R	(5'-cga ttg gtc aag aat aca gca gcc gcg att gcg aga acg aag-3')
TP-K25A/K27A-L	(5'-ctt cgt tct cgc aat cgc ggc tgc tgt att ctt gac caa tcg-3')
TP-R30A-R	(5'-aaa gcc aag att gcg gca acg aag aaa aag ta-3')
TP-R30A-L	(5'-tac ttt ttc ttc gtt gcc gca atc ttg gct tt-3')
TP-K32A-R	(5'-aag att gcg aga acg gcg aaa aag tat ggt gt-3')
TP-K32A-L	(5'-aca cca tac ttt ttc gcc gtt ctc gca atc tt-3')
TP-K33A-R	(5'-att gcg aga acg aag gca aag tat ggt gta ga-3')
TP-K33A-L	(5'-tct aca cca tac ttt gcc ttc gtt ctc gca at-3')
TP-K34A-R	(5'-aag att gcg aga acg aag aaa gcg tat ggt gt-3')
TP-K34A-L	(5'-aca cca tac gct ttc ttc gtt ctc gca atc tt-3')
TP-K32A/K33A/K34A-R	(5'-agc caa gat tgc gag aac ggc ggc agc gta tgg tgt aga cct tac c-3')
TP-K32A/K33A/K34A-L	(5'-ggg aag gtc tac acc ata cgc tgc gcc gtt ctc gca atc ttg gct-3')

<b>TP-R54A-R</b>	(5'-gat tca ttt gaa aca gcg gcg cag ttc aat aa-3')
<b>TP-R54A- L</b>	(5'-tta ttg aac tgc gcc gct gtt tca aat gaa tc-3')
<b>TP-K59A-R</b>	(5'-cgg gcg cag ttc aat gcg tgg aag gaa caa gc-3')
<b>TP-K59A-L</b>	(5'-gct tgt tcc ttc cac gca ttg aac tgc gcc cg-3')
<b>TP-K61A-R</b>	(5'-cag ttc aat aag tgg gcg gaa caa gcg tcc tc-3')
<b>TP-K61A- L</b>	(5'-gag gac gct tgt tcc gcc cac tta ttg aac tg-3')
<b>TP-R70A-R</b>	(5'-tcc tct ttc act aac gct gct aat atg-3')
<b>TP-R70A-L</b>	(5'-cat att agc agc gtt agt gaa aga gga-3')
<b>Nt16-70-EcoRI-L</b>	(5'-cga act gat aac gga att cct aac ggt tag tga aag-3')
<b>Nt16-73-EcoRI-L</b>	(5'-gca ttc ttt tcg aag aat tcc tac ata tta gca cgg-3')
<b>TP-ΔN10-XhoI-R</b>	(5'-cgt ata cgc ctc gag gat aat gac aaa gcc g-3')
<b>TP-ΔN15 XhoI-R</b>	(5'-gga taa tga cct cga gga ata cgc tcg att gg-3')
<b>TP-ΔN20 XhoI-R</b>	(5'-ccg aat acg ctc tcg agg tca aga ata caa aag cc-3')
<b>TP-ΔNt XhoI-R</b>	(5'-cta acc gtg ctc tcg agc gtt atc agt tcg-3')
<b>TP EcoRI-L</b>	(5'-cct tta aga att cct aga acc cct tta agc-3')
<b>Nt1-24-R</b>	(5'-cgc tcg att ggt caa gaa tac ata ata aaa gat tgc gag aac gaa g-3')
<b>Nt1-24-L</b>	(5'-ctt cgt tct cgc aat ctt tta tta tgt att ctt gac caa tcg agc g-3')
<b>Nt1-37-R</b>	(5'-cga aga aaa agt atg gtg tat agt aaa ccg ctg aaa ttg ata tac-3')
<b>Nt1-37-L</b>	(5'-gta tat caa ttt cag cgg ttt act ata cac cat act ttt tct tcg-3')
<b>Nt1-50-R</b>	(5'- gat ata ctt gac ctt gat tca taa taa aca cgg gcg cag ttc aat aag- 3')
<b>Nt1-50-L</b>	(5'-ctt att gaa ctg cgc ccg tgt tta tta tga atc aag gtc agg tat atc-3')
<b>Nt1-60-R</b>	(5'-cac ggg cgc agt tca ata agt ggt aat aac aag cgt cct ctt tca cta ac-3')
<b>Nt1-60-L</b>	(5'-gtt agt gaa aga gga cgc ttg tta tta cca ctt att gaa ctg cgc ccg tg-3')
<b>Nt1-70-R</b>	(5'-cgt cct ctt tca cta acc gtt aat aaa tgc gtt atc agt tcg aaa ag-3')
<b>Nt1-70-L</b>	(5'-ctt ttc gaa ctg ata acg cat tta tta acg gtt agt gaa aga gga cg-3')
<b>Nt1-73-R</b>	(5'-cta acc gtg cta ata tgt gat aac agt tcg aaa aga atg-3')
<b>Nt1-73-L</b>	(5'-cat tct ttt cga act gtt atc aca tat tag cac ggt tag-3')
<b>NtI-R</b>	(5'-gaa cag acc ctc agt agt aag aaa aga aaa tga ta-3')
<b>NtI-L</b>	(5'-tat cat ttt ctt ttc tta cta ctg agg gtc tgt tc-3')
<b>TP_1</b>	(5'-cat gcg cta gcg aaa gga gat aa cgc aac atg gcg aga ag-3')
<b>TP_2</b>	(5'-ttt aag cat gcc tag aac ccc ttt aag ctt aga tc-3')
<b>TP XmaI-R</b>	(5'-gga gat aac ccg gga tgg cga gaa gtc cac gta tac gc-3')
<b>TP EagI-L</b>	(5'-gct tca tcc ttt aac ggc cgc tag aac ccc ttt aag ctt ag-3')
<b>Nt EagI-L</b>	(5'-gca ttc ttt tcc ggc cgt tat cac ata tta gca cgg tta gtg aaa g-3')
<b>NtI EagI-L</b>	(5'-ctg tat cat ttt cgg ccg tta cta ctg agg gtc tgt tct cat ctc-3')
<b>ICt XmaI-R</b>	(5'-cac taa ccg tcc cgg gat gcg tta tca gtt cg-3')
<b>TP-ΔN15 XmaI-R</b>	(5'-gca tta agg ata atc ccg gga tgg aat acg ctc gat tgg-3')
<b>TP-ΔN20 XmaI-R</b>	(5'-caa agc cga ata ccc cgg gat ggt caa gaa tac aaa agc c-3')
<b>R-OUT-SUPER</b>	(5'-aaa tag att ttc ttt ctt ggc tac-3')
<b>R-25</b>	(5'-aaa gta ggg tac agc gac aac ata c-3')
<b>yshC-R</b>	(5'-ccg cgg atc cca tca ttt tac ggg-3')
<b>yshC-L</b>	(5'-ggg tcg aca ctt cct gtc cgc ttt cac g-3')
<b>φR68-T</b>	(5'-ttt cat ccc atg tcg ctg ttg tat gtg gta aag ggg taa ctg gct gat aga agc tgt tct tag att gt-3')
<b>φR68-D</b>	(5'-aaa gta ggg tac agc gac aac ata cac cat ttc ccc att gac cga cta tct tcg aca aga atc taa ca-3')
<b>gyrB-R</b>	(5'-ctg cag cgt tac aaa ggt ctt ggt-3')
<b>gyrB-L</b>	(5'-agt ctc atc cgc atc cat tgc atc-3')

mreB-R	(5'-gac cgt acg gct gaa gcg att aaa-3')
mreB-L	(5'-ggc aaa cct gtg agc aaa tcg c-3')
ung-R	(5'-cgg acc gaa tta ttg acg tgc tga gt-3')
ung-L	(5'-ctc caa ata ggc att cgc ccg gga aa-3')
ftsZ-R	(5'-cag tga ttg caa ccg gct tta tcg-3')
ftsZ-L	(5'-ttt tgg ctc acg ctt cgg aac a-3')

Tabla MS2. Estirpes utilizadas

Estirpe	Genotipo relevante	Construcción, origen o referencia
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	$\phi 80dlacZ\Delta M15$ , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrAB</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_K^-$ , $m_K^+$ ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $\Delta(lacZYA-argF)U169$ , <i>phoA</i>	Stock del laboratorio
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_K^-$ , $m_K^+$ ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F', <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta M15::Tn10$ (tet <sup>r</sup> )]	Stock del laboratorio
BL21(DE3)	<i>F</i> <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( $r_B^-$ , $m_B^-$ ), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , $\lambda(DE3)$	Stock del laboratorio
DM-049	XL1-Blue que contiene el plásmido pDP150-CFP	pDP150-CFP → XL1-Blue (Amp)
DM-050	XL1-Blue que contiene el plásmido pDP150-CFP/TP	pDP150-CFP/TP → XL1-Blue (Amp)
DM-051	XL1-Blue que contiene el plásmido pDP150-CFP/TP PRD1	pDP150-CFP/TP PRD1 → XL1-Blue (Amp)
TP-strep	BL21(DE3) que contiene el plásmido pET-52b(+)-TP	pET-52b(+)-TP → BL21(DE3) (Amp)
TPR19A-strep	BL21(DE3) que contiene el plásmido pET-52b(+)-TPR19A	pET-52b(+)-TPR19A → BL21(DE3) (Amp)
TPK25A-strep	BL21(DE3) que contiene el plásmido pET-52b(+)-TPK25A	pET-52b(+)-TPK25A → BL21(DE3) (Amp)
TPK27A-strep	BL21(DE3) que contiene el plásmido pET-52b(+)-TPK27A	pET-52b(+)-TPK27A → BL21(DE3) (Amp)
TPK25A/K27A-strep	BL21(DE3) que contiene el plásmido pET-52b(+)-TPK25A/K27A	pET-52b(+)-TPK25A/K27A → BL21(DE3) (Amp)
TPK32A/K33A/K34A-strep	BL21(DE3) que contiene el plásmido pET-52b(+)-TPK32A/K33A/K34A	pET-52b(+)-TPK32A/K33A/K34A → BL21(DE3) (Amp)
TPNt-strep	BL21(DE3) que contiene el plásmido pET-52b(+)-TPNt	pET-52b(+)-TPNt → BL21(DE3) (Amp)
TPNt+I-strep	BL21(DE3) que contiene el plásmido pET-52b(+)-TPNt+I	pET-52b(+)-TPNt+I → BL21(DE3) (Amp)
TPAN15-strep	BL21(DE3) que contiene el plásmido pET-52b(+)-TPAN15	pET-52b(+)-TPAN15 → BL21(DE3) (Amp)
TPAN20-strep	BL21(DE3) que contiene el plásmido pET-52b(+)-TPAN20	pET-52b(+)-TPAN20 → BL21(DE3) (Amp)
TPANt-strep	BL21(DE3) que contiene el plásmido pET-52b(+)-TPANt	pET-52b(+)-TPANt → BL21(DE3) (Amp)
<b><i>B. subtilis</i></b>		
168	<i>trpC2</i> , considerada la estirpe <i>wild-type</i>	<i>Bacillus Genetic Stock Center</i>
168 $\Delta spo0A$	<i>trpC2</i> $\Omega(spo0A::kan)$	SWV215 → 168 (Kan)
MO-101-P	<i>thr spo0A</i> <sup>+</sup> <i>su</i> <sup>+</sup>	Mellado <i>et al.</i> , 1976 (1)
110NA	<i>trpC2 spo0A3 su</i>	Moreno <i>et al.</i> , 1974 (2)
SWV215	<i>trpC2 pheA1</i> $\Omega(spo0A::kan)$	Xu and Strauch, 1996 (3)
DM-020	<i>trpC2</i> $\Omega(amyE::P_{xyl}-yfp-p2\ spc)$	pSGDM3 → 168 (Spc)
DM-021	<i>trpC2</i> $\Omega(amyE::P_{xyl}-yfp-TP\ spc)$	pSGDM4 → 168 (Spc)
DM-022	<i>trpC2</i> $\Omega(amyE::P_{xyl}-yfp\ spc)$	pSG5472 → 168 (Spc)
DM-023	<i>trpC2</i> $\Omega(amyE::P_{xyl}-yfp-p2\ spc)$ $\Omega(thrC::P_{hyper-spank}-cfp-TP\ erm)$	pSGDM3, pDP150-CFP → 168 (Spc)
DM-024	<i>trpC2</i> $\Omega(thrC::P_{hyper-spank}-cfp\ erm)$	pDP150-CFP → 168 (Erm)



<b>DM-025</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>thrC</i> :: <i>P<sub>hyper-spank</sub></i> - <i>cfp-TP erm</i> )	pDP150-CFP/TP → 168 (Erm)
<b>DM-026</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>thrC</i> :: <i>P<sub>hyper-spank</sub></i> - <i>cfp-TPNt erm</i> )	pDP150-CFP/TP-Nt → 168 (Erm)
<b>DM-027</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>thrC</i> :: <i>P<sub>hyper-spank</sub></i> - <i>cfp-TPNtI erm</i> )	pDP150-CFP/TP-NtI → 168 (Erm)
<b>DM-028</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>thrC</i> :: <i>P<sub>hyper-spank</sub></i> - <i>cfp-TPI erm</i> )	pDP150-CFP/TP-I → 168 (Erm)
<b>DM-029</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>thrC</i> :: <i>P<sub>hyper-spank</sub></i> - <i>cfp-TP<math>\Delta</math>Nt erm</i> )	pDP150-CFP/TP- $\Delta$ Nt → 168 (Erm)
<b>DM-030</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>thrC</i> :: <i>P<sub>hyper-spank</sub></i> - <i>cfp-TPCt erm</i> )	pDP150-CFP/TP-Ct → 168 (Erm)
<b>3725</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ <i>chr</i> :: <i>neo3427<math>\Delta</math>mreB</i>	Formstone and Errington, 2005 (4)
<b>DM-031</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TP spc</i> ) $\Omega$ ( <i>neo3427</i> ) $\Delta$ <i>mreB</i>	3725 → DM-021 (Erm)
<b>DM-032</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>thrC</i> :: <i>P<sub>hyper-spank</sub></i> - <i>gen 3 erm</i> )	pDP150-TP → 168 (Erm)
<b>BS126</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ <i>chr</i> :: <i>rpoC-yfp kan</i>	Davies <i>et al.</i> , 2005 (5)
<b>DM-033</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>thrC</i> :: <i>P<sub>hyper-spank</sub></i> - <i>cfp-TP erm</i> ) $\Omega$ ( <i>rpoC</i> :: <i>rpoC-yfp kan</i> )	pDP150-CFP/TP → BS126 (Erm)
<b>DM-060</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>thrC</i> :: <i>P<sub>hyper-spank</sub></i> - <i>cfp-TP PRD1 erm</i> )	pDP150-CFP/TP-PRD1 → 168 (Spc)
<b>YFP-R3A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPR3A spc</i> )	pSGIH-TPR3A → 168 (Spc)
<b>YFP-R6A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPR6A spc</i> )	pSGIH-TPR6A → 168 (Spc)
<b>YFP-R8A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPR8A spc</i> )	pSGIH-TPR8A → 168 (Spc)
<b>YFP-K10A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPK10A spc</i> )	pSGIH-TPK10A → 168 (Spc)
<b>YFP-K14A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPK14A spc</i> )	pSGIH-TPK14A → 168 (Spc)
<b>YFP-R19A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPR19A spc</i> )	pSGIH-TPR19A → 168 (Spc)
<b>YFP-K22A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPK22A spc</i> )	pSGIH-TPK22A → 168 (Spc)
<b>YFP-K25A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPK25A spc</i> )	pSGIH-TPK25A → 168 (Spc)
<b>YFP-K27A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPK27A spc</i> )	pSGIH-TPK27A → 168 (Spc)
<b>YFP-K25A/K27A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPK25A/K27A spc</i> )	pSGIH-TPK25A/K27A → 168 (Spc)
<b>YFP-R30A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPR30A spc</i> )	pSGIH-TPR30A → 168 (Spc)
<b>YFP-K32A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPK32A spc</i> )	pSGIH-TPK32A → 168 (Spc)
<b>YFP-K33A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPK33A spc</i> )	pSGIH-TPK33A → 168 (Spc)
<b>YFP-K34A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPK34A spc</i> )	pSGIH-TPK34A → 168 (Spc)
<b>YFP-K32A/K33A/K34A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPK32A/K33A/K34A spc</i> )	pSGIH-TPK32A/K33A/K34A → 168 (Spc)
<b>YFP-R54A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPR54A spc</i> )	pSGIH-TPR54A → 168 (Spc)
<b>YFP-K59A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPK59A spc</i> )	pSGIH-TPK59A → 168 (Spc)
<b>YFP-K61A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPK61A spc</i> )	pSGIH-TPK61A → 168 (Spc)
<b>YFP-R70A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPR70A spc</i> )	pSGIH-TPR70A → 168 (Spc)
<b>YFP-Nt24</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPNt 1-24 spc</i> )	pSGIH-TPNt 1-24 → 168 (Spc)
<b>YFP-Nt37</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPNt 1-37 spc</i> )	pSGIH-TPNt 1-37 → 168 (Spc)
<b>YFP-Nt50</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPNt 1-50 spc</i> )	pSGIH-TPNt 1-50 → 168 (Spc)
<b>YFP-Nt60</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPNt 1-60 spc</i> )	pSGIH-TPNt 1-60 → 168 (Spc)
<b>YFP-Nt70</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPNt 1-70 spc</i> )	pSGIH-TPNt 1-70 → 168 (Spc)
<b>YFP-Nt73</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPNt 1-73 spc</i> )	pSGIH-TPNt 1-73 → 168 (Spc)
<b>YFP-Nt+I</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPNt+I spc</i> )	pSGIH-TPNt+I → 168 (Spc)
<b>YFP-Nt16-70</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPNt 16-70 spc</i> )	pSGIH-TPNt 16-70 → 168 (Spc)
<b>YFP-Nt16-73</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TPNt 16-73 spc</i> )	pSGIH-TPNt 16-73 → 168 (Spc)
<b>YFP-<math>\Delta</math>N10</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TP<math>\Delta</math>N10 spc</i> )	pSGIH-TP- $\Delta$ N10 → 168 (Spc)
<b>YFP-<math>\Delta</math>N15</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TP<math>\Delta</math>N15 spc</i> )	pSGIH-TP- $\Delta$ N15 → 168 (Spc)
<b>YFP-<math>\Delta</math>N20</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TP<math>\Delta</math>N20 spc</i> )	pSGIH-TP- $\Delta$ N20 → 168 (Spc)
<b>YFP-<math>\Delta</math>Nt</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TP-<math>\Delta</math>Nt spc</i> )	pSGIH-TP- $\Delta$ Nt → 168 (Spc)
<b>YFP-TP wt <math>\Delta</math>spo0A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TP spc</i> ) $\Omega$ ( <i>spo0A</i> :: <i>kan</i> )	SWV215 → DM021 (Kan)
<b>YFP-<math>\Delta</math>Nt <math>\Delta</math>spo0A</b>	<i>trpC2</i> $\Omega$ ( <i>amyE</i> :: <i>P<sub>xyI</sub></i> - <i>yfp-TP-<math>\Delta</math>Nt spc</i> ) $\Omega$ ( <i>spo0A</i> :: <i>kan</i> )	SWV215 → YFP- $\Delta$ N73 (Kan)

## Material Suplementario

<b>YFP-R19A Δspo0A</b>	<i>trpC2 Ω(amyE::P<sub>xyf</sub>-yfp-TPR19A spc) Ω(spo0A::kan)</i>	SWV215 → YFP-R19A (Kan)
<b>YFP-K25A Δspo0A</b>	<i>trpC2 Ω(amyE::P<sub>xyf</sub>-yfp-TPK25A spc) Ω(spo0A::kan)</i>	SWV215 → YFP-K25A (Kan)
<b>YFP-K27A Δspo0A</b>	<i>trpC2 Ω(amyE::P<sub>xyf</sub>-yfp-TPK27A spc) Ω(spo0A::kan)</i>	SWV215 → YFP-K27A (Kan)
<b>YFP-K25A/K27A Δspo0A</b>	<i>trpC2 Ω(amyE::P<sub>xyf</sub>-yfp-TPK25A/K27A spc) Ω(spo0A::kan)</i>	SWV215 → YFP-K25A/K27A (Kan)
<b>YFP-K32A/K33A/K34A Δspo0A</b>	<i>trpC2 Ω(amyE::P<sub>xyf</sub>-yfp-TPK32A/K33A/K34A spc) Ω(spo0A::kan)</i>	SWV215 → YFP-K32A/K33A/K34A (Kan)
<b>YFP-p2/CFP</b>	<i>trpC2 Ω(amyE::P<sub>xyf</sub>-yfp-p2 spc) Ω(thrC::P<sub>hyper-spank</sub>-cfp erm)</i>	pDP150-CFP-2 → DM-020 (Erm)
<b>YFP-p2/CFP-TP wt</b>	<i>trpC2 Ω(amyE::P<sub>xyf</sub>-yfp-p2 spc) Ω(thrC::P<sub>hyper-spank</sub>-cfp-TP erm)</i>	pDP150-CFP/TP → DM-020 (Erm)
<b>YFP-p2/CFP-TP ΔNt</b>	<i>trpC2 Ω(amyE::P<sub>xyf</sub>-yfp-p2 spc) Ω(thrC::P<sub>hyper-spank</sub>-cfp-TPΔNt erm)</i>	pDP150-CFP/TP-ΔNt → DM-020 (Erm)
<b>YFP-p2/CFP-TP R19A</b>	<i>trpC2 Ω(amyE::P<sub>xyf</sub>-yfp-p2 spc) Ω(thrC::P<sub>hyper-spank</sub>-cfp-TPR19A erm)</i>	pDP150-CFP/TPR19A → DM-020 (Erm)
<b>YFP-p2/CFP-TP K25A</b>	<i>trpC2 Ω(amyE::P<sub>xyf</sub>-yfp-p2 spc) Ω(thrC::P<sub>hyper-spank</sub>-cfp-TPK25A erm)</i>	pDP150-CFP/TPK25A → DM-020 (Erm)
<b>YFP-p2/CFP-TP K27A</b>	<i>trpC2 Ω(amyE::P<sub>xyf</sub>-yfp-p2 spc) Ω(thrC::P<sub>hyper-spank</sub>-cfp-TPK27A erm)</i>	pDP150-CFP/TPK27A → DM-020 (Erm)
<b>YFP-p2/CFP-TP K25A/K27A</b>	<i>trpC2 Ω(amyE::P<sub>xyf</sub>-yfp-p2 spc) Ω(thrC::P<sub>hyper-spank</sub>-cfp-TPK25A/K27A erm)</i>	pDP150-CFP/TPK25A/K27A → DM-020 (Erm)
<b>YFP-p2/CFP-TP K32A/K33A/K34A</b>	<i>trpC2 Ω(amyE::P<sub>xyf</sub>-yfp-p2 spc) Ω(thrC::P<sub>hyper-spank</sub>-cfp-TPK32A/K33A/K34A erm)</i>	pDP150-CFP/TPK32A/K33A/K34A → DM-020 (Erm)
<b><i>S. cerevisiae</i></b>		
<b>PJ69-4a</b>	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2met2::GAL7-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996 (6)
<b>PJ69-4a</b>	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2met2::GAL7-lacZ</i>	Noirot-Gros <i>et al.</i> , 2002 (7)
<b>yNG132</b>	PJ69-4a, pGAD	Noirot-Gros <i>et al.</i> , 2002 (7)
<b>yNG3811</b>	PJ69-4a, pGAD::gen 3 de φ29	Esta tesis
<b>yNG3763</b>	PJ69-4a, pGAD::hbs	Tatiana Rochat (sin publicar)
<b>yNG3255</b>	PJ69-4a, pGAD::yyaA	Jean-Christophe Meile (sin publicar)
<b>yNG1928</b>	PJ69-4a, pGAD::smc	Dervyn <i>et al.</i> , 2004 (8)
<b>yNG64</b>	PJ69-4a, pGAD::scpA	Dervyn <i>et al.</i> , 2004 (8)
<b>yNG66</b>	PJ69-4a, pGAD::scpB	Dervyn <i>et al.</i> , 2004 (8)
<b>yNG121</b>	PJ69-4a, pGBDU	Noirot-Gros <i>et al.</i> , 2002 (7)
<b>yNG3809</b>	PJ69-4a, pGBDU::gen 2 de φ29	Esta tesis
<b>yNG3765</b>	PJ69-4a, pGBDU::hbs	Etienne Dervyn (sin publicar)
<b>yNG3257</b>	PJ69-4a, pGBDU::yyaA	Jean-Christophe Meile (sin publicar)
<b>yNG129</b>	PJ69-4a, pGBDU::smc	Dervyn <i>et al.</i> , 2004 (8)
<b>yNG74</b>	PJ69-4a, pGBDU::scpA	Dervyn <i>et al.</i> , 2004 (8)

Las abreviaturas de los antibióticos son: amp, ampicilina; erm, eritromicina; kan, kanamicina; spc, espectinomycin. “X” → “Y” indica que la estirpe Y fue transformada con DNA procedente de la fuente X, con el marcador seleccionado entre paréntesis: Amp, ampicilina; Kan, kanamicina; Erm, eritromicina; Spc, espectinomycin.

- (1) Mellado, R.P., Viñuela, E. and Salas, M. (1976) Isolation of a strong suppressor of nonsense mutations in *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem*, **65**, 213-223.
- (2) Moreno, F. (1974) Suppressor-sensitive mutants and genetic map of *Bacillus subtilis* bacteriophage φ29. *Virology*, **62**, 1-16.
- (3) Xu, K. and Strauch, M.A. (1996) Identification, sequence, and expression of the gene encoding γ-glutamyltranspeptidase in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **178**, 4319-4322.
- (4) Formstone, A. and Errington, J. (2005) A magnesium-dependent *mreB* null mutant: implications for the role of *mreB* in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **55**, 1646-1657.
- (5) Davies, K.M., Dedman, A.J., van Horck, S. and Lewis, P.J. (2005) The NusA:RNA polymerase ratio is increased at sites of rRNA synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **57**, 366-379.



- (6) James, P., Halladay, J. and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-1436.
- (7) Noirot-Gros, M.F., Dervyn, E., Wu, L.J., Mervelet, P., Errington, J., Ehrlich, S.D. and Noirot, P. (2002) An expanded view of bacterial DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8342-8347.
- (8) Dervyn, E., Noirot-Gros, M.F., Mervelet, P., McGovern, S., Ehrlich, S.D., Polard, P. and Noirot, P. (2004) The bacterial condensin/cohesin-like protein complex acts in DNA repair and regulation of gene expression. *Mol Microbiol*, **51**, 1629-1640.

Tabla MS3. Bacteriófagos utilizados

Bacteriófago	Origen o referencia
$\phi 29$ <i>wild-type</i>	Stock del laboratorio
<i>sus14</i> (1242)	Jiménez <i>et al.</i> , 1977 (1)
<i>sus3</i> (91)	Moreno <i>et al.</i> , 1974 (2)
<i>sus2</i> (513)	Moreno <i>et al.</i> , 1974 (2)

- (1) Jiménez, F., Camacho, A., De La Torre, J., Viñuela, E. and Salas, M. (1977) Assembly of *Bacillus subtilis* phage  $\phi 29$ . 2. Mutants in the cistrons coding for the non-structural proteins. *Eur J Biochem*, **73**, 57-72.
- (2) Moreno, F. (1974) Suppressor-sensitive mutants and genetic map of *Bacillus subtilis* bacteriophage  $\phi 29$ . *Virology*, **62**, 1-16.

Tabla MS4. Plásmidos utilizados

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pSG5472	Derivado del plásmido pSG1729 que contiene el gen <i>yfpmut2</i> en lugar de <i>gfpmut1</i>	A. Formstone (sin publicar)
pSGDM3	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::p2</i>	Muñoz-Espín <i>et al.</i> , 2009 (1)
pSGDM5	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP</i>	Esta tesis
pDR200	Vector que contiene el gen <i>cfp</i> ( <i>Bs</i> ) optimizado para la expresión en <i>B. subtilis</i>	Doan <i>et al.</i> , 2005 (2)
pDP150	Derivado del vector de integración en el sitio <i>thrC</i> pDR111 que contiene el promotor <i>P<sub>hyper-spank</sub></i>	Kearns and Losick, 2005 (3)
pDP150-CFP	pDP150 que contiene el gen <i>cfp</i> ( <i>Bs</i> )	Esta tesis
pDP150-CFP-2	pDP150-CFP que contiene una diana de restricción de SpeI en el sitio de clonación múltiple	Esta tesis
pDP150-CFP-TP PRD1	pDP150-CFP-2 que contiene la fusión <i>cfp::TP PRD1</i>	Esta tesis
pDP150-CFP-TP	pDP150-CFP-2 que contiene la fusión <i>cfp::TP</i>	Esta tesis
pDP150-CFP-TP Nt	pDP150-CFP-2 que contiene la fusión <i>cfp::TP-Nt</i>	Esta tesis
pDP150-CFP-TP Nt+I	pDP150-CFP-2 que contiene la fusión <i>cfp::TP-NtI</i>	Esta tesis
pDP150-CFP-TP I	pDP150-CFP-2 que contiene la fusión <i>cfp::TP-I</i>	Esta tesis
pDP150-CFP-TP I+Ct	pDP150-CFP-2 que contiene la fusión <i>cfp::TP-ANt</i>	Esta tesis

<b>pDP150-CFP-TP Ct</b>	pDP150-CFP-2 que contiene la fusión <i>cfp::TP-Ct</i>	Esta tesis
<b>pDP150-CFP-TP R19A</b>	pDP150-CFP-2 que contiene la fusión <i>cfp::TPR19A</i>	Esta tesis
<b>pDP150-CFP-TP K25A</b>	pDP150-CFP-2 que contiene la fusión <i>cfp::TPK25A</i>	Esta tesis
<b>pDP150-CFP-TP K27A</b>	pDP150-CFP-2 que contiene la fusión <i>cfp::TPK27A</i>	Esta tesis
<b>pDP150-CFP-TP K25A/K27A</b>	pDP150-CFP-2 que contiene la fusión <i>cfp::TPK25A/K27A</i>	Esta tesis
<b>pDP150-CFP-TP K32A/K33A/K34A</b>	pDP150-CFP-2 que contiene la fusión <i>cfp::TPK32A/K33A/K34A</i>	Esta tesis
<b>pDP150-TP</b>	pDP150 que contiene el gen 3 de $\phi 29$	Esta tesis
<b>pSGIH-TP R3A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-R3A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP R6A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-R6A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP R8A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-R8A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP K10A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-K10A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP K14A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-K14A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP R19A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TPR19A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP K22A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-K22A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP K25A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-K25A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP K27A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-K27A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP K25A/K27A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-K25A/K27A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP R30A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-R30A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP K32A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-K32A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP K33A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-K33A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP K34A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-K34A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP-K32A/K33A/K34A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-K32A/K33A/K34A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP R54A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-R54A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP K59A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-K59A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP K61A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-K61A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP R70A</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-R70A</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP Nt1-24</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-Nt1-24</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP Nt1-37</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-Nt1-37</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP Nt1-50</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-Nt1-50</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP Nt1-60</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-Nt1-60</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP Nt1-70</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-Nt1-70</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP Nt1-73</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-Nt1-73</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP Nt+I</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-Nt+I</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP Nt16-70</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-Nt16-70</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP Nt16-73</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-Nt16-73</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP-<math>\Delta</math>N10</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-<math>\Delta</math>N10</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP-<math>\Delta</math>N15</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-<math>\Delta</math>N15</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP-<math>\Delta</math>N20</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-<math>\Delta</math>N20</i>	Esta tesis
<b>pSGIH-TP-<math>\Delta</math>Nt</b>	pSG5472 que contiene la fusión <i>yfp::TP-<math>\Delta</math>Nt</i>	Esta tesis
<b>pET52b(+)</b>	Vector de expresión de <i>E. coli</i> para purificación de proteínas	Novagen
<b>pET52b(+)-TP</b>	pET52b(+) que contiene el gen 3 de $\phi 29$	Esta tesis

<b>pET52b(+)-TP R19A</b>	pET52b(+) que contiene el gen 3 mutante R19A de $\phi$ 29	Esta tesis
<b>pET52b(+)-TP K25A</b>	pET52b(+) que contiene el gen 3 mutante K25A de $\phi$ 29	Esta tesis
<b>pET52b(+)-TP K27A</b>	pET52b(+) que contiene el gen 3 mutante K27A de $\phi$ 29	Esta tesis
<b>pET52b(+)-TP K25A/K27A</b>	pET52b(+) que contiene el gen 3 mutante K25A/K27A de $\phi$ 29	Esta tesis
<b>pET52b(+)-TP K32A/K33A/K34A</b>	pET52b(+) que contiene el gen 3 mutante K32A/K33A/K34A de $\phi$ 29	Esta tesis
<b>pET52b(+)-TP Nt</b>	pET52b(+) que contiene la secuencia correspondiente al dominio Nt de la TP de $\phi$ 29	Esta tesis
<b>pET52b(+)-TP Nt+I</b>	pET52b(+) que contiene la secuencia correspondiente a los dominios Nt+I de la TP de $\phi$ 29	Esta tesis
<b>pET52b(+)-TP-<math>\Delta</math>N15</b>	pET52b(+) que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 16-266 de la TP de $\phi$ 29	Esta tesis
<b>pET52b(+)-TP-<math>\Delta</math>N20</b>	pET52b(+) que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 21-266 de la TP de $\phi$ 29	Esta tesis
<b>pET52b(+)-TP-<math>\Delta</math>Nt</b>	pET52b(+) que contiene la secuencia correspondiente a los dominios I+Ct de la TP de $\phi$ 29	Esta tesis

- (1) Muñoz-Espín, D., Daniel, R., Kawai, Y., Carballido-López, R., Castilla-Llorente, V., Errington, J., Meijer, W.J. and Salas, M. (2009) The actin-like MreB cytoskeleton organizes viral DNA replication in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 13347-13352.
- (2) Doan, T., Marquis, K.A. and Rudner, D.Z. (2005) Subcellular localization of a sporulation membrane protein is achieved through a network of interactions along and across the septum. *Mol Microbiol*, **55**, 1767-1781.
- (3) Kearns, D.B. and Losick, R. (2005) Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev*, **19**, 3083-3094.